



ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผลและความเป็นพิษ
ของสารผสมเคอเวซิทินและเคอร์คูมินอยด์

ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT, WOUND HEALING ACTIVITIES, AND CYTOTOXICITY
OF QUERCETIN AND CURCUMINOIDS MIXTURE

อมรรัตน์ แม่นไธสง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผลและความเป็นพิษ
ของสารผสมเคอเวซีทินและเคอร์คูมินอยด์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT, WOUND HEALING ACTIVITIES, AND CYTOTOXICITY
OF QUERCETIN AND CURCUMINOIDS MIXTURE



AMORN RAT MANTHAISONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผลและความเป็นพิษ

ของสารผสมเคอเวซิทินและเคอร์คูมินอยด์

ของ

อมรรัตน์ แม่นไธสง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี่) (รองศาสตราจารย์ ดร.นริศ คำแก่น)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโก) (รองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวร)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผลและความเป็นพิษของสารผสมเคอเวซิทินและเคอร์คูมินอยด์
ผู้วิจัย	อมรรัตน์ แม่นไธสง
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

งานวิจัยนี้ได้นำสารสองชนิดมาผสมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผล ผลการศึกษาพบว่าสารละลายผสมระหว่างเคอเวซิทินและเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* DMST 8013 และ *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501 ในขณะที่สารเดี่ยวไม่มีฤทธิ์ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•]) และเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) พบว่าทั้งสองวิธีเคอเวซิทินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดการใช้สารผสมจึงควรใช้เคอเวซิทินในอัตราส่วนที่มากกว่า ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HDFb ด้วยวิธี MTT assay และทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Scratch assay) พบว่าที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$ และ 7.5 $\mu\text{g/mL}$ ของเคอเวซิทินและเคอร์คูมินอยด์ ตามลำดับไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์พบว่าสารละลายเคอเวซิทิน 7.5 $\mu\text{g/mL}$ มีค่ามากที่สุด จึงสรุปได้ว่าสารผสมเคอเวซิทินและเคอร์คูมินอยด์ที่อัตราส่วน 3:1 มีความเหมาะสมเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการเคลื่อนที่ซิดกันและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นเตรียมตำรับนาโนเจลระบบไฮลิดิลิพิดนาโนพาร์ติเคิลที่มีสารผสมของเคอเวซิทิน 30 $\mu\text{g/mL}$ และเคอร์คูมินอยด์ 10 $\mu\text{g/mL}$ พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV คอลัมน์ C-18 (250 mm \times 4.6 mm I.D.:5 μm) ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่คือ acetonitrile:0.1 % phosphoric acid (4:6) อุณหภูมิ 35°C อัตราการไหล 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที 20 μL ที่ความยาวคลื่น 390 nm ซึ่งวิธีวิเคราะห์พีคของนาโนเจลสามารถแยกออกจากสารผสมได้ชัดเจน มีถูกต้องและแม่นยำสอดคล้องกับแนวทาง ICH guideline 2005 และ AOAC guideline 2002

คำสำคัญ : การรักษาบาดแผล, เคอเวซิทิน, เคอร์คูมินอยด์, เสริมฤทธิ์, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Title	ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT, WOUND HEALING ACTIVITIES, AND CYTOTOXICITY OF QUERCETIN AND CURCUMINOIDS MIXTURE
Author	AMORNRAT MANTHAISONG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Weerasak Samee
Co Advisor	Chuda Chittasupho
Co Advisor	Sarin Tadtong

In this work, quercetin and curcuminoids were combined to synergistically enhance the wound healing effect. The results showed that the mixture of quercetin and curcuminoid mixture was at 250 µg/mL showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* DMST 8013 and *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, while a single substance did not demonstrate any activity against it. The antioxidant activities of DPPH• and ABTS•+ showed that the maximum activity was achieved with a higher ratio of quercetin. The cytotoxicity test on the HDFb cells lined by the MTT assay showed no cytotoxicity at 12.5 µg/mL and 7.5 µg/mL of quercetin and curcuminoid solutions, respectively. The highest wound closure percentage was 7.5 µg/mL of quercetin solution. The optimal ratio of quercetin and curcuminoids was 3:1 to obtain antibacterial, antioxidant, and wound closure. Then, the nanogel with solid-lipid nanoparticle at 30 µg/mL quercetin and 10 µg/mL curcuminoids was formulated. The method development and validation was achieved by HPLC-UV with C-18 column particle size 5 µm, 150 mm x 4.6 mm, i.d.), using acetonitrile: 0.1% phosphoric acid (4 : 6) as mobile phase, 35°C temp, 1.3 ml/min flow rate, injection volume was 20 µL, and a 390 nm detector. All peaks of nanogel were well separated from quercetin and curcuminoids. The developed method was sensitive, specific, accurate, and precisely corresponded with the ICH Guidelines of 2005 and the AOAC Guidelines of 2002.

Keyword : Wound healing, Quercetin, Curcuminoids, Synergism, HPLC

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ได้ดำเนินการและสำเร็จไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับคำแนะนำ และสนับสนุนตลอดด้วยดีต้องขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วีรศักดิ์ สามี ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รวมถึง รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโก และ รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมทั้งสามท่านได้สละเวลาเพื่อให้คำแนะนำให้คำปรึกษา สั่งสอน เอาใจใส่ตลอดระยะเวลาในการดำเนินการตั้งแต่เริ่มต้นดำเนินการวิจัยจนทุกอย่างแล้วเสร็จไปได้ด้วยดีผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภายในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ได้สั่งสอนและให้วิชาความรู้ รวมไปถึงห้องปฏิบัติการภายในที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการใช้เป็นสถานที่ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยต้องกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนส่งเสริมจนผู้วิจัยดำเนินการทุกอย่างได้อย่างราบรื่นจนสำเร็จเป็นปริญญาานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

อมรรัตน์ แม่นไธสง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	2
4. ขอบเขตการวิจัย	3
5. นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
6. กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
7. สมมติฐาน.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. กระบวนการหายของแผล	5
1.1 ระยะการอักเสบ (inflammatory phase).....	5
1.2 ระยะเพิ่มจำนวน (proliferative phase).....	7
1.3 ระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase).....	8
2. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหายของแผล	9

2.1 โปรตีนและกรดอะมิโน (protein and amino acids)	9
2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates)	9
2.3 ไขมันและกรดไขมันจำเป็น (lipids and essential fatty acids)	9
2.4 วิตามินและแร่ธาตุ (vitamins and mineral).....	9
3. สารเคมีจากสมุนไพรที่มีการทดสอบว่าช่วยซ่อมแซมบาดแผล	10
3.1 เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside)	11
3.2 เคอร์คูมิน (curcumin).....	12
3.3 กรดคลอโรจินิก (chlorogenic acid).....	13
3.4 เคอเวซีทิน (quercetin).....	13
3.5 กรดแกลลิก (gallic acid).....	14
4. เทคนิคการประเมินฤทธิ์การสมานแผล	15
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity).....	15
4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+)	16
4.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•)	17
4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+)	17
4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ด้วยวิธี MTT assay	19
4.6. การทดสอบความสามารถในการสมานแผลโดยทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay).....	20
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรช่วยสมานแผล	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	24
1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	24
1.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ	24

1.2 สารเคมี	25
1.3 จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง	26
2. การเตรียมตัวอย่างสารในการวิจัย	26
2.1 เตรียมตัวอย่างทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)	26
2.2 เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีไอเอส (ABTS•+)	26
2.3 เตรียมตัวอย่างทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ด้วยวิธี MTT assay	27
2.4 เตรียมตัวอย่างทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)	27
2.5 เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ HPLC-UV method	27
3. การวิเคราะห์ทดสอบ	28
3.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)	28
3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีไอเอส (ABTS•+)	29
3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	31
3.4 การทดสอบผลของเคอเซทิน (quercetin) และเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)	34
3.5 การทดสอบหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย UV-Vis spectrophotometer	35
3.6 การทดสอบ HPLC-UV method	35
4. การวิเคราะห์ข้อมูล	37
5. วิธีการดำเนินการวิจัย และเก็บข้อมูล	37
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	38
1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)	38
2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีไอเอส (ABTS•+)	41

2.1 ผลทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•)	42
2.2 ผลทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีไอเอส (ABTS•+).....	44
3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ด้วยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ (HDFb)	46
4. ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)	52
5. ผลการทดลองเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV method.....	53
5.1 การทดลองเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV – Vis spectrophotometer.....	53
5.2 วิเคราะห์ HPLC-UV method.....	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	64
สรุปผลการวิจัย	64
ข้อเสนอแนะ	66
บรรณานุกรม	67
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียน.....	84

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงประสิทธิภาพของสารเคมีจากสมุนไพรที่มีการทดสอบฤทธิ์ช่วยในการรักษาบาดแผล . 1	
ตาราง 2 แสดงเกณฑ์มาตรฐาน ICH guideline 2005 ของ System Suitability Test (SST).....	36
ตาราง 3 แสดงค่าการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> DMST 8013 และ <i>P. aeruginosa</i> DMST 15501 ของ quercetin และ curcuminoids.....	40
ตาราง 4 แสดงค่าการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> DMST 8013 และ <i>P. aeruginosa</i> DMST 15501 สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ในอัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3.....	41
ตาราง 5 แสดงค่า IC ₅₀ และค่า TEAC ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH•)	42
ตาราง 6 แสดงค่า IC ₅₀ และค่า TEAC ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS•+)	45
ตาราง 7 แสดง % cell viability และ IC ₅₀ ของ quercetin, curcuminoids และสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	49
ตาราง 8 แสดงผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง โดยแสดงเป็นค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% wound closure).....	53
ตาราง 9 แสดงเกณฑ์มาตรฐาน ICH guideline 2005 ของ System Suitability Test (SST).....	58
ตาราง 10 แสดงค่า Retention time, Peak area, Theoretical plate number, resolution, %RSD, Peak symmetry ของ quercetin และ curcuminoids (ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin).....	58
ตาราง 11 ตารางแสดงค่า Regression equation และ R ² ของ quercetin และ curcuminoids (ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin)	60

ตาราง 12 แสดงค่า LOD, LOQ ของสารสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids (ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin) 61

ตาราง 13 แสดงค่า % recovery และ %RSD ของ quercetin และ curcuminoids ภายในวันเดียวกัน (intra day) และระหว่างวัน (inter day) 63



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 แสดงระยะที่มีเลือดออกและการอักเสบ	6
ภาพประกอบ 2 แสดงระยะเพิ่มจำนวนด้วยการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยและมีการงอกขยายของเนื้อเยื่อ .	7
ภาพประกอบ 3 แสดงระยะปรับเปลี่ยนใหม่เพื่อทำให้บาดแผลมีความแข็งแรงมากขึ้น	8
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของ asiaticoside	11
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ curcumin.....	12
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ chlorogenic acid.....	13
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ quercetin.....	13
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ gallic acid	14
ภาพประกอบ 9 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยน MTT ไปเป็น formazan product.....	19
ภาพประกอบ 10 แสดง human dermal fibroblasts: HDF (A), immunolabeled for vimentin (red) (B) and stained for FSP (green) (C). nuclei are visualized with DAPI (B, C, blue)..	21
ภาพประกอบ 11 ภาพด้านบนของแชมเบอร์สำหรับนับจำนวนเซลล์.....	22
ภาพประกอบ 12 แสดงการสารทดสอบใน 24 well plate.....	35
ภาพประกอบ 13 กราฟแสดง % cell viability ของ quercetin, curcuminoids และสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	51
ภาพประกอบ 14 แสดง UV spectrum ของ quercetin, curcuminoids และ SLN base.....	54
ภาพประกอบ 15 แสดงโครมาโทแกรมของ SLN base (A), quercetin (B), curcuminoids (C) และสารผสม quercetin และ curcuminoids ใน SLN base (D)	56
ภาพประกอบ 16 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin และ curcuminoids (ประกอบด้วย BDMC, DMC, curcumin)	57

สัญลักษณ์และคำย่อ

Avg.	=	ค่าเฉลี่ย
BDMC	=	bisdemethoxycurcumin
Conc.	=	ความเข้มข้น
DMC	=	demethoxycurcumin
cells/mL	=	เซลล์ต่อมิลลิลิตร
g	=	กรัม
g/mL	=	กรัมต่อมิลลิลิตร
hr.	=	ชั่วโมง
mm	=	มิลลิเมตร
mm ²	=	ตารางมิลลิเมตร
mg	=	มิลลิกรัม
mL	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
nm	=	นาโนเมตร
SD	=	ค่าเฉลี่ย
µg/mL	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µg	=	ไมโครลิตร
%v/v	=	ร้อยละโดยปริมาตร
%w/w	=	ร้อยละโดยมวล
°C	=	องศาเซลเซียส
≤	=	น้อยกว่าหรือเท่ากับ
>	=	มากกว่า

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

บาดแผล (wound) คือ สภาวะที่ร่างกายได้รับบาดเจ็บจนเกิดความเสียหายมีการฉีกขาดของผิวหนังและเนื้อเยื่อ โดยปกติแล้วเมื่อได้รับบาดแผลร่างกายจะมีกระบวนการบำบัดรักษาเองตามธรรมชาติ แต่จะใช้เวลานานเนื่องจากมีความซับซ้อนของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ การหายของแผลนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะหลัก ๆ คือ ระยะที่ 1 ระยะอักเสบ (inflammatory phase) ระยะที่ 2 ระยะเพิ่มจำนวน (proliferative phase) ระยะที่ 3 ระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase) ซึ่งระยะที่มีความสำคัญต่อการหายของแผลมากที่สุดคือระยะอักเสบ ถ้าระยะนี้กินเวลานานจากการติดเชื้อหรือปฏิกิริยาภายในเซลล์เกิดความล่าช้าการหายของแผลก็จะช้าตามไปด้วย จากผลการวิจัยสารเคมีจากสมุนไพรที่มีส่วนช่วยในการรักษาบาดแผลได้แก่ asiaticoside, curcumin, chlorogenic acid, quercetin และ gallic acid พบว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลดัง ตาราง 1 (Rajkumar, Nadar, & Selvakumar, 2018)

ตาราง 1 แสดงประสิทธิภาพของสารเคมีจากสมุนไพรที่มีการทดสอบฤทธิ์ช่วยในการรักษาบาดแผล

Class Compounds	Phase 1			Phase 2		Phase 2,3		Phase 3
	A	B	C	D	E	F	G	H
asiaticoside	/			/			/	
curcumin	/	/	/	/		/	/	
chlorogenic acid	/	/		/			/	
quercetin	/	/			/	/	/	/
gallic acid	/	/	/					

**A=antioxidation, B=anti-inflammatory, C= infection prevention, D=angiogenesis induction, E=antifibrotic agent, F=increasing fibroblast, G=increasing collagen, H= wound closure

จากตาราง 1 พบว่าสารเคมีจากสมุนไพรที่มีส่วนช่วยในการรักษาบาดแผลที่มีความน่าสนใจ คือ curcumin (เคอร์คูมิน) และ quercetin (เคอเวเซทิน) เพราะถ้านำสารทั้งสองชนิดมารวมกันจะให้ประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลครบทั้ง 3 ระยะ (Phase 1, 2, 3) และมีฤทธิ์ครอบคลุมทั้ง A=antioxidation, B=anti-inflammatory, C= infection prevention, D=angiogenesis induction, E=antifibrotic agent, F=increasing fibroblast, G=increasing collagen, และ H=wound closure ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าการนำสารทั้งสองชนิดนี้มาตั้งตำรับน่าจะให้ผลในการรักษาบาดแผลได้ดี ซึ่งจะต้องศึกษาเพิ่มเติมว่าสารผสมระหว่าง quercetin (เคอเวเซทิน) และ curcuminoids (เคอร์คูมินอยด์) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ผิวหนังและมีความเป็นพิษหรือไม่ เพื่อกำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมในตำรับในการควบคุมคุณภาพของตำรับจะต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตำรับสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids (bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) และ curcumin ด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC)

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids

2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ผิวหนังของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids

2.3 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids

2.4 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ในตำรับ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

เพื่อให้ได้ข้อมูลของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผล และความเป็นพิษของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids เพื่อใช้กำหนดความเข้มข้นของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ในตำรับ และสามารถนำการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มี quercetin และ curcuminoids เป็นองค์ประกอบ

4. ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH และ ABTS และฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ด้วยการ Scratch assay รวมไปถึงทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ human dermal fibroblast (HDFb) ด้วยวิธี MTT assay ของสาร quercetin และ curcuminoids และพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ด้วยเทคนิค HPLC

ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น

ความเข้มข้นของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids

อัตราส่วนของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids

ตัวแปรตาม

ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

ฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่เชื่อมติดกันของเซลล์เพาะเลี้ยง HDFb

ความเป็นพิษและการเจริญที่มีต่อเซลล์ HDFb

5. นิยามศัพท์เฉพาะ

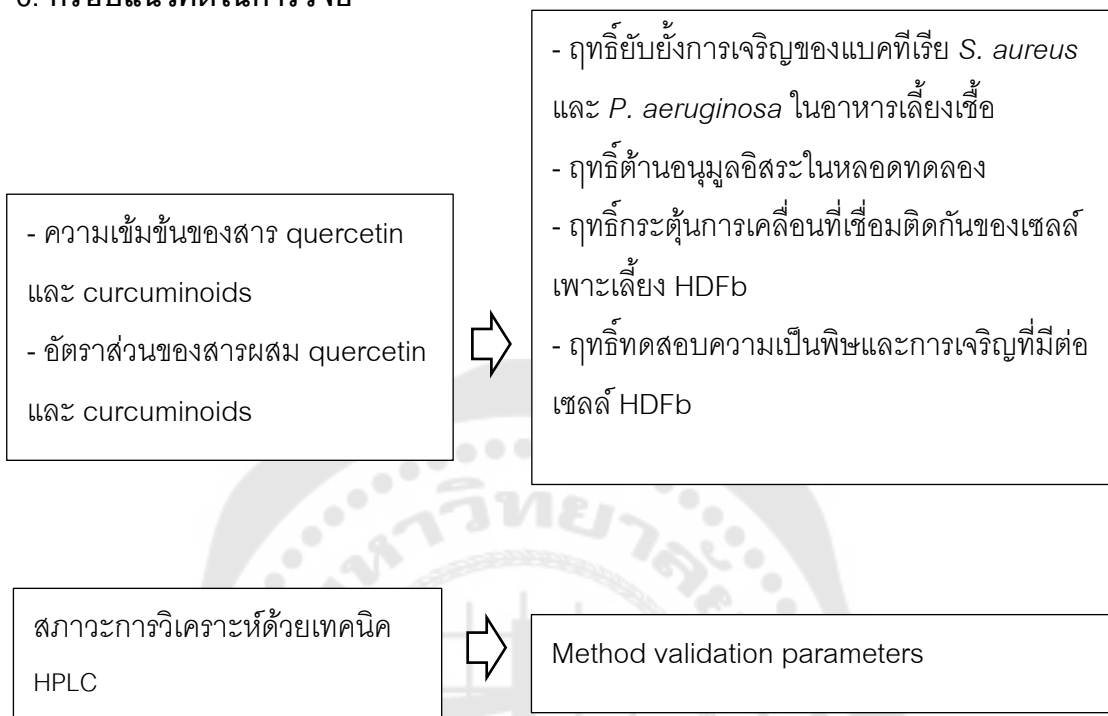
ตำรับสารผสม คือ สารที่ประกอบด้วย quercetin และ curcuminoids ที่ผสมกันอยู่ในตัว ทำละลายและมองเห็นเป็นเนื้อเดียวกันไม่แยกชั้น

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ ความสามารถของ quercetin, curcuminoids และตำรับสารผสมที่ความเข้มข้นที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50 % ขึ้นไป

ความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ ความเข้มข้นของ quercetin, curcuminoids และตำรับสารผสมที่มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) น้อยกว่า 80 %

ฤทธิ์ในการสมานแผล คือ ความสามารถของสารละลาย quercetin และ curcuminoids ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ระยะเวลาน้อยในการหายของแผลจากการเคลื่อนที่เชื่อมติดกันของเซลล์เพาะเลี้ยง (HDFb) และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (HDFb)

6. กรอบแนวคิดในการวิจัย



7. สมมติฐาน

- 3.1 สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง
- 3.2 สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids มีฤทธิ์สมานแผลได้ดีกว่าสารเดี่ยว
- 3.3 สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids มีความเป็นพิษต่ำกว่าสารเดี่ยว
- 3.4 วิธีวิเคราะห์สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids มีความถูกต้อง แม่นยำตามข้อกำหนด ของ AOAC guideline 2002 และ ICH guideline 2005

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. กระบวนการหายของแผล
2. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหายของแผล
3. สารเคมีจากสมุนไพรที่มีการทดสอบว่าช่วยซ่อมแซมบาดแผล
4. เทคนิคการประเมินฤทธิ์การสมานแผล
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล

1. กระบวนการหายของแผล

กระบวนการหายของแผลมีความซับซ้อนและเกิดขึ้นเป็นขั้นเป็นตอนจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ และบางระยะมีการซ้อนทับกันจนไม่สามารถแยกออกได้อย่างชัดเจนเมื่อพิจารณาแบ่งระยะการหายของแผลสามารถแบ่งได้ดังนี้ระยะแรกคือ ระยะการอักเสบ (inflammatory phase) เป็นระยะที่มีกระบวนการให้เลือดหยุดไหลและกำจัดเชื้อโรค รวมทั้งขจัดเนื้อเยื่อที่ตาย ระยะที่สองคือ ระยะเพิ่มจำนวน (proliferative phase) ส่วนระยะสุดท้ายที่ใช้ระยะเวลานานที่สุดคือ ระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase) เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรง รายละเอียดของแต่ละระยะมีกระบวนการต่าง ๆ เกิดขึ้นดังนี้

1.1 ระยะการอักเสบ (inflammatory phase)

จะเกิดขึ้นวันที่ 0-3 โดยประมาณ ซึ่งเป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นทันทีเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บคือร่างกายจะพยายามห้ามเลือด (hemostasis) โดย fibrillary collagen และ tissue factor กระตุ้นให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า clotting cascade ซึ่งประกอบไปด้วย หลอดเลือด เกิดเลือด การสร้างลิ่มเลือด ที่ทำงานประสานกันเมื่อได้รับบาดเจ็บหลอดเลือดจะหลั่งสาร prostacyclin (PGI₂), von Willebrand factor (vWF), tissue plasminogen activator (t-PA) ทำให้เกิดการหดตัวและกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยเกล็ดเลือดจะหลั่ง growth factors เช่น platelet-derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factor P (TGF- β) เกิดเป็นลิ่มเลือดโดยเปลี่ยนไฟบริโนเจน (fibrinogen) ให้เป็นไฟบริน (fibrin) กลายเป็นร่างแหเกิดการห้ามเลือดขึ้นในขณะเดียวกันนี้กระบวนการซ่อมเนื้อเยื่อก็ทำงานพร้อมกัน ต่อมาก็

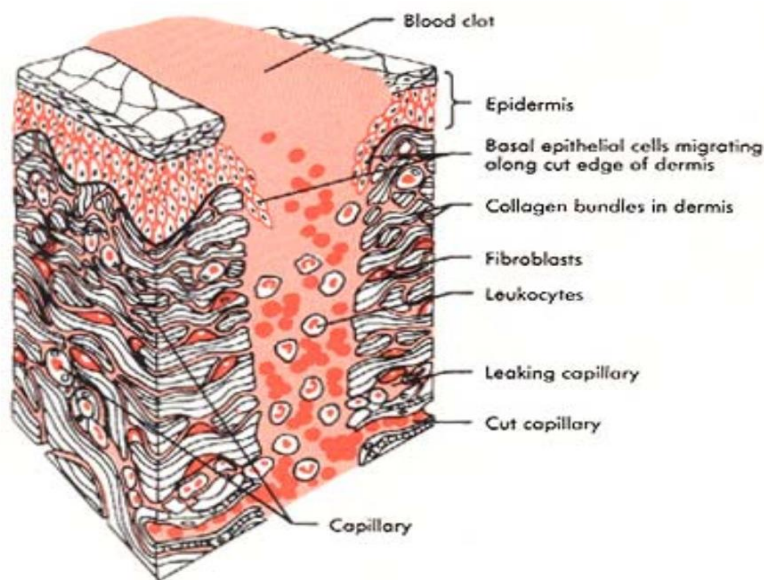
จะเป็นหน้าที่ของ inflammatory cells ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดอาการ ปวด บวม แดง ร้อน จากการที่ หลอดเลือดขยายตัว (vasodilation) เซลล์เม็ดเลือดขาวจึงเริ่มทำงานดังนี้

1.1.1 neutrophils เกิดขึ้นในวันที่ 2 จะทำหน้าที่กำจัดเนื้อตายโดยย่อย extracellular matrix (ECM) ด้วยกระบวนการ phagocytosis เพื่อป้องกันไม่ให้แผลเกิดการติดเชื้อ

1.1.2 macrophages จะเกิดขึ้นหลังเกิดแผล 48-72 ชั่วโมงโดย monocyte chemoattractant protein 1 กระตุ้นให้ monocytes เปลี่ยนเป็น macrophages ทำหน้าที่ในการกำจัดเนื้อตายและแบคทีเรียในแผล กระตุ้นให้มีการสร้าง ECM ทั้งกระตุ้นการสร้าง fibroblast และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ซึ่งถือเป็นส่วนที่สำคัญมากต่อการหายของแผล

1.1.3 lymphocytes ชนิด T-lymphocytes มีหน้าที่สร้างแอนติบอดี (antibody) เสริมภูมิคุ้มกันให้กับเซลล์มีส่วนสำคัญในการส่งผลต่อการหายของแผลในขั้นตอนถัดไป

1.1.4 mast cell เป็นส่วนที่ทำหน้าที่กำจัดเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ประกอบไปด้วยสารหลายชนิด เช่น ฮีสตามีน (histamine), tumor necrosis factor (TNF), prostaglandins และ protease ในเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บจะมีปริมาณของ mast cell เพิ่มขึ้น 4 เท่า

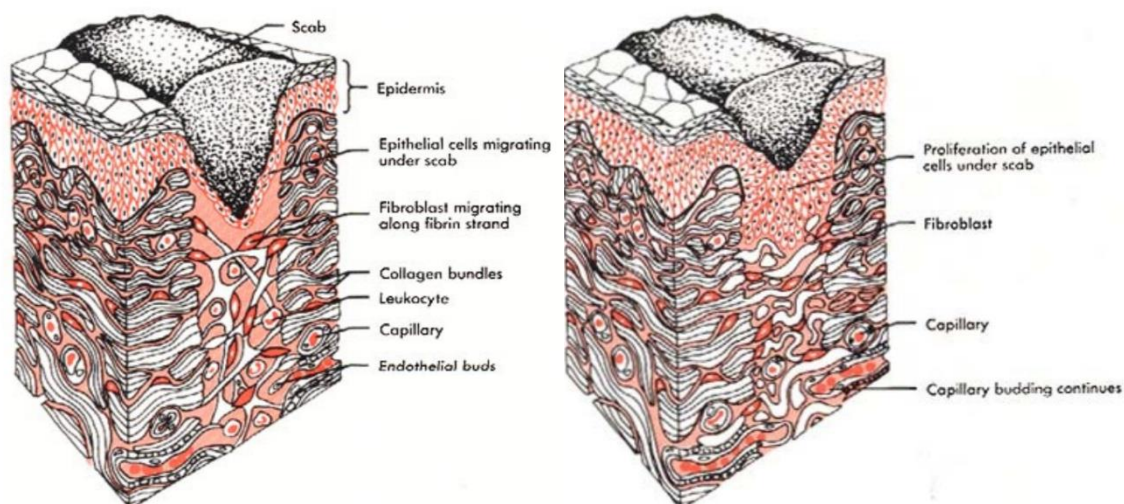


ภาพประกอบ 1 แสดงระยะที่มีเลือดออกและการอักเสบ

ที่มา: (สุมิตรา พงษ์ศิริ, 2561)

1.2 ระยะเวลาเพิ่มจำนวน (proliferative phase)

ระยะนี้จะเกิดขึ้นในวันที่ 4-21 แต่ถ้านับจริง ๆ แล้วกระบวนการนี้มีบางส่วนเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ได้รับบาดเจ็บแผลซึ่งเกิดขึ้นทับกับระยะแรกโดยการเกิด re-epithelialization ซึ่งเป็นกระบวนการที่บริเวณขอบแผลมีการแยกตัวของ keratinocytes เพื่อเคลื่อนตัวออกมาปิดบาดแผล โดยจะเริ่มมีการสะสมของไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เอนโดทีเลียม (endothelium) และมาโครฟาจ (macrophages) ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะสร้าง ECM และหลอดเลือดใหม่ โดยจะสร้างไปจนปริมาณ collagen matrix เพิ่มจำนวนจนเต็มบาดแผล กระบวนการต่าง ๆ จะหยุดลงโดยระยะนี้ ECM (fibronectin vitronectin type I collagen) จะมาแทนที่ fibrin matrix กลายเป็น granulation tissue เป็นเนื้อเยื่อใหม่ที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดการตายของเซลล์ก่อนหน้านี้ จะมีลักษณะเป็นตุ่มสีแดงเกิดขึ้นในแผลที่ใกล้จะหายซึ่งขณะเกิดเซลล์นี้จะเกิดขึ้นทับกับการอักเสบ ดังนั้นถ้าการอักเสบไม่หยุดลง granulation tissue ก็จะถูกกระบวนการอักเสบกำจัดไปด้วยและการทำลายจะค่อย ๆ ลดลงตามระยะอักเสบจนกระบวนการอักเสบสิ้นสุดลง และมีการสร้างมากขึ้นจนเห็นลักษณะเป็นตุ่มเนื้อแดงที่แผลเพื่ออุดช่องว่างหรือโพรงของแผล และเข้าสู่ระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase)



ภาพประกอบ 2 แสดงระยะเพิ่มจำนวนด้วยการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยและมีการงอกขยายของเนื้อเยื่อ

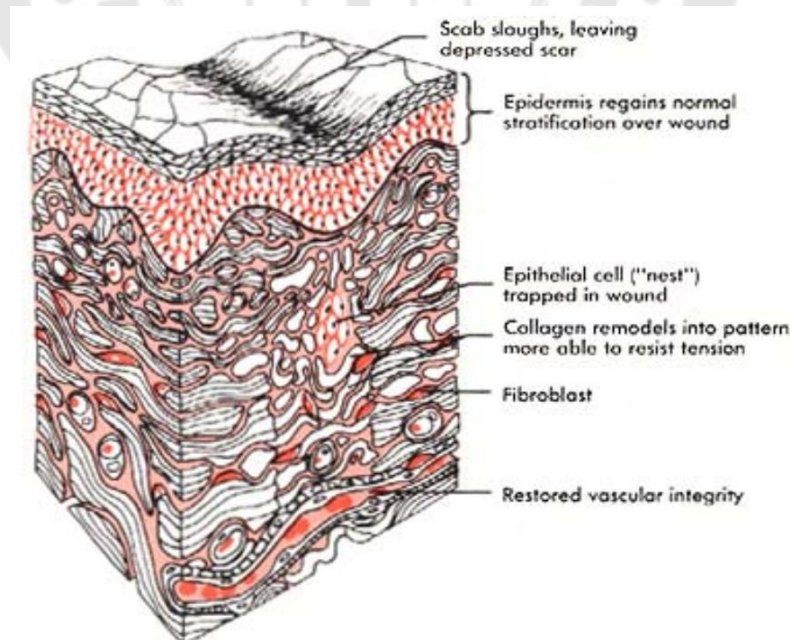
ที่มา: (สุมิตรา พงษ์ศิริ, 2561)

1.3 ระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase)

เป็นระยะที่นานที่สุดระยะนี้จะเริ่มต้นประมาณวันที่ 21 ของการเกิดแผลยาวนานไปเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยระยะนี้เริ่มขึ้นตั้งแต่แผลถูกเติมเต็มด้วย granulation tissue และขอบแผลเกิด re-epithelialization แล้วกระบวนการนี้จะเป็นกระบวนการที่ทำให้บาดแผลมีความแข็งแรงมากขึ้นประกอบไปด้วย

1.3.1 การหดของแผล (wound contraction) โดย fibroblast จะรวมตัวกับ intracellular actin microfilament เกิดเป็น myofibroblast ทำให้เกิดการหดของแผล

1.3.2 เกิดการปรับเปลี่ยนคอลลาเจน (collagen remodeling) จะค่อยๆ เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งเกิดจากการที่ type III collagen มีการปรับเปลี่ยนใหม่โดยถูกแทนที่ด้วย type I collagen ซึ่งมีความแข็งแรงมากกว่า เอนไซม์ที่สำคัญสำหรับกระบวนการนี้คือ matrix metalloproteinases (MMP) ซึ่งหลั่งมาจาก macrophages, fibroblasts และ endothelial cells ในสัปดาห์ 3 แผลจะค่อยแข็งแรงมากขึ้นเป็นร้อยละ 20 และแข็งแรงขึ้นสูงสุดเพียงร้อยละ 70-80 ระยะการหายของแผลเวลาสิ้นสุดโดยใช้เวลาทั้งสิ้น 1 ปี (วันเฉลิม จงศิริวัฒนา, 2561)



ภาพประกอบ 3 แสดงระยะปรับเปลี่ยนใหม่เพื่อทำให้บาดแผลมีความแข็งแรงมากขึ้น

ที่มา: (สุมิตรา พงษ์ศิริ, 2561)

2. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหายของแผล

กระบวนการหายของแผลนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างซึ่งปัจจัยที่มีผลทำให้การหายของแผลเกิดความล่าช้าได้แก่ โรคประจำตัว อายุ และปัจจัยทางด้านโภชนาการภาวะโภชนาการที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการรักษาบาดแผล เพราะกระบวนการทางชีววิทยาหลายอย่างในเซลล์ผิวหนังต้องการสารอาหารสำหรับการบำรุงรักษาการซ่อมแซมและช่วยในการทำงานของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ สารอาหารหลักที่ช่วยในการซ่อมแซมบาดแผลประกอบด้วย

2.1 โปรตีนและกรดอะมิโน (protein and amino acids)

เป็นสารอาหารที่มีความสำคัญในการรักษาบาดแผลเพราะโปรตีนเป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับเนื้อเยื่อในการเจริญเติบโตและการซ่อมแซมเซลล์เมื่อได้รับบาดเจ็บโดยเป็นส่วนประกอบสำคัญของเม็ดเลือดแดงที่จะนำออกซิเจนเข้าไปภายในเนื้อเยื่อของบาดแผลและมีผลต่อหลายขั้นตอนของการรักษาแผลดังนี้ กลไกการห้ามเลือด (hemostasis) การอักเสบ (inflammation) การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue formation) การขยายตัวของเซลล์ การปรับโครงสร้างของเนื้อเยื่อ และการสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของคอลลาเจนอีลาสติก ดังนั้นถ้าร่างกายขาดโปรตีนจะทำให้การสังเคราะห์คอลลาเจนลดลง ความแข็งแรงของบาดแผลลดลง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเสียไป การจับกินของเม็ดเลือดขาวเสื่อมลงทำให้เกิดการติดเชื้อของแผลได้ง่ายซึ่งส่งผลให้ระยะเวลาในการหายของแผลนานขึ้นอีกด้วย

2.2 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates)

เป็นแหล่งพลังงานหลักในกิจกรรมการเผาผลาญอาหารที่ช่วยในการขยายตัวของไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวไฟโบรบลาสต์

2.3 ไขมันและกรดไขมันจำเป็น (lipids and essential fatty acids)

เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนัง มีความสำคัญสำหรับการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ (phospholipids epidermal) ปฏิกิริยาการอักเสบและการสังเคราะห์เมทริกซ์ภายในเซลล์

2.4 วิตามินและแร่ธาตุ (vitamins and mineral)

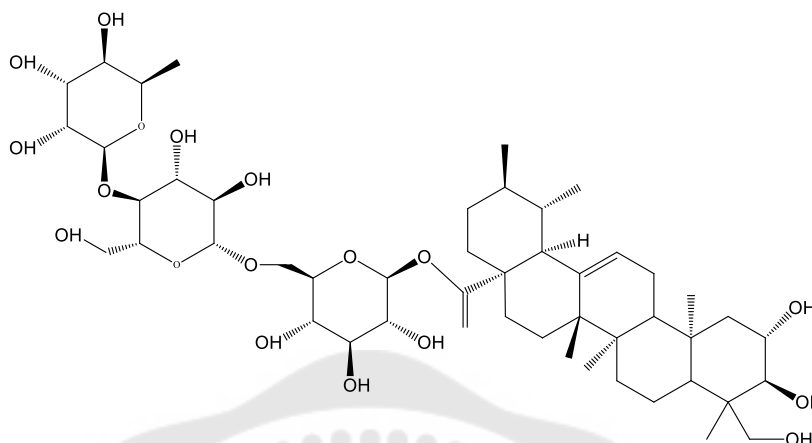
วิตามินเอมีความสำคัญต่อการซ่อมแซมบาดแผลในระยะอักเสบซึ่งโดยปกติจะใช้เวลานานในแผลเรื้อรังโดยวิตามินเอจะไปยับยั้งกระบวนการสร้างคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) ซึ่งเป็นตัวที่เพิ่มโอกาสในการทำให้แผลติดเชื้อมีส่วนร่วมในการควบคุมไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งเป็นโครงสร้างของคอลลาเจนและการสังเคราะห์ไกลโคลิพิด (glycolipid) การผลิตโพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) วิตามินบีช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น

เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน วิตามินซีช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจนและช่วยในการดูดซึมธาตุเหล็กและแคลเซียมซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยในการหายของแผล รวมทั้งช่วยในการสังเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นส่วนช่วยฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน วิตามินอีช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจนจึงทำให้บาดแผลหายได้เร็วขึ้น วิตามินเคช่วยในการแข็งตัวของเลือดเพื่อไม่ให้เลือดหยุดไหลในระยะแรกของการเกิดบาดแผลและยังช่วยป้องกันไม่ให้แผลเกิดการติดเชื้อ แคลเซียมช่วยในการขยายตัวของเซลล์ต้นกำเนิดหนังกำพร้าและช่วยในกระบวนการฟื้นฟูบาดแผล ทองแดงมีส่วนช่วยในการสร้างคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติก (elastic fibers) เหล็กเป็นแร่ธาตุสำคัญในการสร้างฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และออกซิเจนที่เป็นส่วนสำคัญของเนื้อเยื่อผิวหนัง ซีลีเนียมช่วยในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน สังกะสีมีความสำคัญในการรักษาบาดแผลรวมทั้งดีเอ็นเออาร์เอ็นเอ โพลีเมอร์โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตช่วยในการรักษาเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (Brown & Phillips, 2010)

3. สารเคมีจากสมุนไพรที่มีการทดสอบว่าช่วยซ่อมแซมบาดแผล

ปกติแล้วบาดแผลจะสามารถหายได้เองด้วยกระบวนการบำบัดรักษาตามธรรมชาติ แต่เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนและใช้ระยะเวลานาน จึงมีการนำพืชสมุนไพรมาช่วยในการบำบัดรักษาบาดแผลและพิษจันสารประกอบจากพืชสมุนไพรซึ่งสารเหล่านี้อยู่ในพืชกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids), น้ำมันหอมระเหย (essential oil), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), แทนนิน (tannin), เทอร์ปีน (terpenoids), ซาโปนิน (saponins) และฟีนอลิก (phenolics) มีคุณสมบัติสำคัญในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการรักษาแผลให้หายได้เร็วขึ้นและการช่วยฟื้นฟูผิว

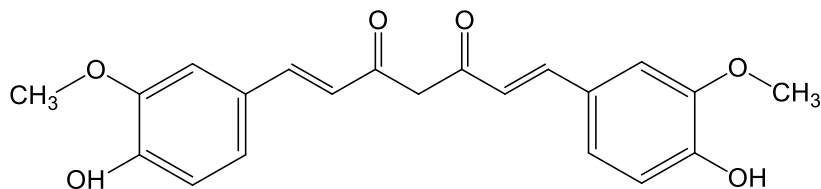
3.1 เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside)



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของ asiaticoside

สารเอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) เป็นสารประกอบไตรเทอร์พีน ซาโปนิน (triterpene saponin) ที่พบในพืชวงศ์ UMBELLIFERAE เป็นสารที่พบในบัวบกที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* Linn.Urban. ซึ่งมีการทดสอบในแผลปกติและแผลจากผู้ที่ เป็นโรคเบาหวาน พบว่าเพิ่มการสร้างไฮดรอกซีไพโรลีน (hydroxyproline) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน และช่วยในการสร้าง angiogenesis ในเนื้อเยื่อ chick chorioallantoic membrane (CAM) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่คลุมอยู่บนเอ็มบริโอซึ่งมีเส้นเลือดจำนวนมากมาย การสร้างการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นของเมทริกซ์คอลลาเจนและกระตุ้นการสังเคราะห์ไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและมีส่วนในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระทั้งกลุ่มที่เป็นเอนไซม์ และกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น glutathione peroxidase (GSH peroxidase), superoxide dismutase (SOD), คตะเลส (catalase), วิตามินอี (vitamin E) และวิตามินซี (vitamin C) ซึ่งจะเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการรักษาบาดแผล

3.2 เคอร์คูมิน (curcumin)

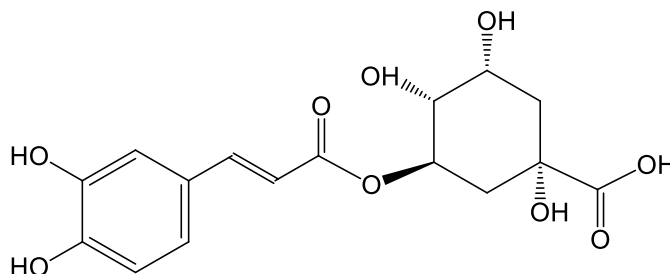


ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ curcumin

เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) ที่พบในพืชวงศ์ ZINGIBERACEAE เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.), ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe), ข่า (*Alpinia galangal* Linn.), กระจ่าง (*Boesenbergia rotunda* Linn.), กระจ่าง (*Amomum testaceum* Ridl.) เป็นต้น ในการซ่อมแซมบาดแผลนั้นที่ความเข้มข้น 5 % W/W มีส่วนช่วยด้านการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการติดเชื้อ curcumin มีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างและสะสมคอลลาเจนการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อโดยการเพิ่มไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เพื่อเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อและยังช่วยทำให้ความหนาแน่นของหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น

ขมิ้นชัน มีสารสำคัญคือเคอร์คูมิน (curcumin) คุณสมบัติของขมิ้นชันที่ช่วยในการรักษาบาดแผลคือ มีคุณสมบัติด้านการอักเสบจากการศึกษาในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าช่วยในการผลิต TNF- α และ IL-1 โดยมาโครเฟจ (macrophages) และยังการทำงานของ phosphorylase kinase (PhK) และการกระตุ้น NF-KB จึงมีการนำขมิ้นชันมาใช้ในการรักษาแผลเรื้อรัง แผลไฟไหม้ และแผลเบาหวาน โดยมีการทดลองฤทธิ์การรักษาแผลจากหนูที่เป็นเบาหวาน พบว่าสามารถทำให้แผลหายได้เร็วขึ้นจากการสร้างเส้นเลือดขึ้นมาใหม่ และพบว่าขมิ้นชันสามารถเพิ่มการสร้างเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase, glutathione peroxidase (GSH peroxidase) และ superoxide dismutase (SOD) จากกระบวนการอักเสบของแผลการเกิดแผลเป็นและแผลเป็นนูน (hypertrophic scar) คีลอยด์ (keloids) เกิดจากการแสดงออกของ TGF- β 1 การแบ่งตัวของไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และการสร้างคอลลาเจนที่มากเกินไปรวมถึงการสังเคราะห์เมทริกซ์นอกเซลล์ (Extra cellular matrix (ECM)) แต่พบว่าขมิ้นชันยับยั้งการส่งสัญญาณ TGF- β 1 ใน fibroblasts keloid (KF) และยังคงลดการผลิต ECM จึงแสดงให้เห็นว่าขมิ้นชันช่วยป้องกันรอยแผลเป็น hypertrophic scar

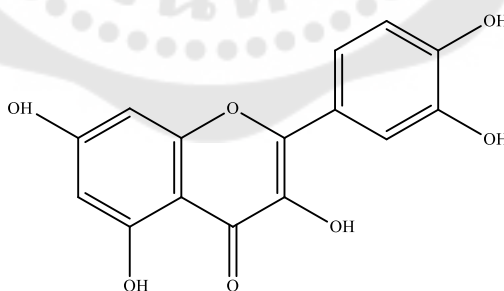
3.3 กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid)



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ chlorogenic acid

กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenolic) พบในกาแฟที่มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Coffea arabica* Linn. (Wani et al., 2014) เป็นพืชวงศ์ RUBIACEAE โดยพบว่ากรดคลอโรจีนิกในการชงนมแช่เมล็ดกาแฟที่มีความเข้มข้น 0.01 g/mL เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยในการการรักษาดแผลรวมทั้งเพิ่มความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอย และเสริมสร้างคอลลาเจน ต้านการอักเสบจากผลของ เอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ในเนื้อเยื่อของบาดแผลที่ส่งผลให้คอลลาเจนที่มีอยู่เกิดการเปราะหัก

3.4 เควอเซทิน (quercetin)

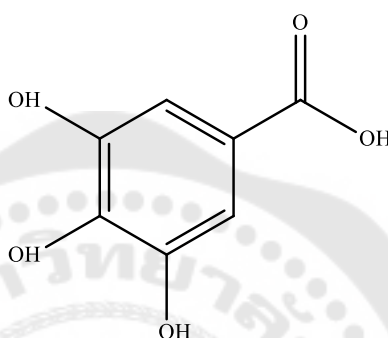


ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ quercetin

เควอเซทิน (quercetin) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) พบมากในหอมแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Allium ascalonicum* Linn. อยู่ในวงศ์ ALLIACEAE และพืชชนิดอื่นวงศ์ถั่ว LEGUMINOSAE มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและต้านมะเร็งและยังเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการสาร

ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการซ่อมแซมบาดแผลโดยเพิ่มการผลิตคอลลาเจนและ ไฟโบรเนกติน (fibronectin) ช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดกับเนื้อเยื่อประสาทเพิ่มการสร้างเซลล์และช่วยในการเชื่อมติดกันของบาดแผลและ quercetin ยังมีฤทธิ์เป็น antifibrotic agent ซึ่งช่วยลดการเกิดแผลเป็น

3.5 กรดแกลลิก (gallic acid)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ gallic acid

กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenolic) พบในชาเขียว (green teas) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Camellia sinensis* Linn. (Bicudo & Santana, 2012) เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ป้องกันมะเร็ง และรักษาบาดแผล ปัจจัยที่ช่วยในการรักษาบาดแผล เช่น c-Jun N-terminal kinases (JNK), focal adhesion kinases (FAK) และ extracellular signal-regulated kinases (Erk) (Rajkumar et al., 2018)

จากข้อมูลการศึกษาศาสตร์เคมีจากสมุนไพรที่มีการทดสอบว่าช่วยซ่อมแซมบาดแผล สารที่มีความน่าสนใจคือ quercetin และ curcuminoids จากข้อมูลจะเห็นว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มการผลิตคอลลาเจน ไฟโบรเนกติน เพิ่มการสร้างเซลล์และช่วยในการเชื่อมติดกันของบาดแผลและมีฤทธิ์เป็น antifibrotic agent ซึ่งช่วยลดการเกิดแผลเป็น จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าช่วยในกระบวนการหายของบาดแผลในระยะที่ 2 และ 3 เป็นส่วนใหญ่ ส่วน curcuminoids มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการติดเชื้อ สร้างและสะสมคอลลาเจนการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อโดยการเพิ่มไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เพื่อเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อและยังช่วยทำให้ความหนาแน่นของหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความสำคัญต่อการหายของบาดแผลในระยะที่ 1 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกนำสารทั้งสองมาผสมกัน

เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการรักษาบาดแผลเมื่อพิจารณาเลือกใช้ตัวทำละลายพบว่าสารทั้งสองละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น dimethoxy sulfoxide (DMSO), เอทานอล, เมทานอล, คลอโรฟอร์มหรืออะซิโตน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ ethanol และ DMSO เป็นตัวทำละลายในครั้งนี้ ซึ่งมีความเหมาะสมและสามารถละลายได้อย่างสมบูรณ์ (Jat, Jain, & Arora, 2015) (Ucisik, Seta, Schuster, & Sleytr, 2013)

4. เทคนิคการประเมินฤทธิ์การสมานแผล

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธีโดยวิธีที่ได้รับความนิยมคือ dilution susceptibility test ที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และ disc diffusion method ที่ทำการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium)

4.1.1 วิธี disc diffusion method เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นวิธีการที่ให้ผลได้แม่นยำถูกต้อง วิธีการนี้จะทดสอบโดยใช้สารที่ต้องการทดสอบหยดลงไปบนกระดาษกรอง (filter paper disc) ที่วางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการแปลผลนั้นจะพิจารณาจากระยะที่ไม่มีเชื้อเติบโตรอบกระดาษกรองที่เรียกว่า โซนใส (inhibition zone) ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีจะยิ่งมีระยะของโซนใสกว้างผลการยับยั้งจะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสซึ่งจะแปลผลผันกับความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration หรือ MIC)

4.1.2 วิธี broth dilution test เป็นการทดสอบเชิงปริมาณจะทำให้ทราบถึงค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) และ MBC (minimum lethal concentration) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อได้ หรือเชื้อมีปริมาณไม่เกินค่าที่กำหนดถ้าเป็นการทดสอบแบคทีเรียจะเรียกว่าค่า MBC (minimum bactericidal concentration) ถ้าเป็นการทดสอบเชื้อราจะเรียกว่าค่า minimum fungicidal concentration (MFC) สามารถทดสอบได้ทั้ง broth macrodilution และ broth microdilution ในงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (ประสาทพรม บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร, & สาทร พรตระกูลพิพัฒน์, 2551) การแปลผลจะพิจารณาจากการสังเกตหลอดที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดนั้นไม่ขุ่น (อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, & ศรีสุดา หาญภาคภูมิ, 2559)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกทดสอบเชื้อที่พบบ่อยว่ามีผลทำให้แผลเกิดการติดเชื้ออีกเสบซึ่งจะไปขัดขวางกระบวนการหายของบาดแผลคือเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบสาร quercetin และ curcuminoids ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ด้วยวิธี disc diffusion method เพื่อให้ทราบว่าตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการต้านเชื้อทั้ง 2 ชนิดหรือไม่และใช้วิธี Broth dilution test เพื่อให้ทราบถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+)

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง การที่อะตอมหรือโมเลกุลเกิดความไม่เสถียรจากการมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัวที่โคจรรอบวงนอกสุดซึ่งโดยปกติของร่างกายที่ไม่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในอะตอมหรือโมเลกุลจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่แต่เมื่อไหร่ก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจะทำให้พันธะระหว่างอะตอมแตกออกจากกันและเกิดอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวเหนี่ยวนำให้โมเลกุลที่อยู่รอบ ๆ เกิดเป็นอนุมูลอิสระตามไปด้วยจากการถูกดึงอิเล็กตรอนทำให้เกิดความไม่เสถียรและเกิดขึ้นต่อเนื่องกับโมเลกุลข้างเคียงไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction)

สาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุทั้งจากการที่ร่างกายสร้างขึ้นเองหรือจากสภาวะภายนอก เช่น มลพิษในอากาศ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดที่มีไขมันไม่อิ่มตัว ไนโตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เป็นต้น ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ ได้แก่

4.2.1 อนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion radical ($O_2 \cdot^-$) และ hydroxyl radical ($HO \cdot$) เป็นต้น

4.2.2 อนุมูลอิสระไนโตรเจน (reactive nitrogen species หรือ RNS) เช่น nitric oxide radical ($NO \cdot$) และ nitrogen dioxide radical ($NO_2 \cdot$) เป็นต้น

ปกติแล้วเมื่อร่างกายได้รับอนุมูลอิสระร่างกายจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกายแต่เมื่อไหร่ที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปกว่าที่ร่างกายจะกำจัดออกได้จึงเกิดการทำลายเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย เมื่อร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอที่จะกำจัดอนุมูลอิสระจึงจำเป็นต้องได้รับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก อนุมูลอิสระที่พบในบาดแผลและทำให้ระยะเวลาการอักเสบยาวนานขึ้นทำให้บาดแผลหายได้ช้ามากขึ้นคือ อนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) โดยพบว่าบาดแผลที่เกิดการ

อีกเสบเรื่อรังส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายดังนั้นเพื่อให้บาดแผลหายเร็วขึ้นจึงต้องกำจัด ROS ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

4.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•)

เป็นวิธีการที่นำสารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูงคือ อนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•, diphenyl-picrylhydrazyl radical) ที่มีสีม่วงและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่องเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) หลักการทำงานคือจะให้ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงที่จางลงจนเป็นสีเหลืองหลังจากการเกิดปฏิกิริยาโดยสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากจะทำให้สีม่วงจางลงมากจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• ข้อดีของวิธีนี้คือง่ายต่อการทดสอบ และสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ ส่วนข้อเสียคือเนื่องจาก DPPH• เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรทำให้ใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยานานไม่ไวเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริงจึงทำให้ค่าต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าค่าความเป็นจริงและไม่สามารถวัดตัวอย่างที่เป็นเลือดได้เนื่องจากวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ที่อาจส่งผลให้เลือดตกตะกอนได้รวมทั้งสารปนเปื้อนโลหะอาจทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH• จางลงได้

4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+)

เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วในการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ และยังเป็นสารที่สามารถละลายได้ทั้งในสารละลายอินทรีย์และในน้ำ รวมไปถึงสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้างซึ่งหลักการของวิธีการนี้คือจะวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) ที่มีสีเขียวอมน้ำเงินซึ่งมีค่าสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 nm โดย ABTS จะถูกทำให้อยู่ในรูปของ ABTS•+ (radical form) จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) กับ potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) หรือเป็นการจำลองอนุมูลอิสระขึ้นนั่นเองแต่เนื่องจาก ABTS•+ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงดังนั้นก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างจึงต้องทำการเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เมื่อนำ ABTS•+ ไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างแล้วจึงพิจารณาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสีที่จางลงจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS•+ แล้วนำค่าการยับยั้งที่ได้มาเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox แต่วิธีนี้มีข้อเสียคืออนุมูลอิสระ ABTS•+ ที่เกิดขึ้นไม่ใช่สารธรรมชาติที่พบภายในเซลล์หรือร่างกายของสิ่งมีชีวิต และต้องทำให้เกิดปฏิกิริยากับสารอื่นเพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าวิธีการที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผสม quercetin และ curcuminoids คือ วิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายสามารถทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ (บุหรณ์ พันธุ์สุวรรณค์, 2013)

การพิจารณาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระคำนวณได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะแสดงเป็นค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % และนำมาคำนวณกับสารมาตรฐาน trolox เพื่อหาค่า TEAC ส่วนค่า % inhibition คำนวณได้จากสมการ (บุหรณ์ พันธุ์สุวรรณค์, 2013) (โกสินทร์ วิระขร, กุลธิดา กล้ารอด, ประณิธิ หงส์ประภาส, & พัชรี บุญศิริ, 2557)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH/ABTS ที่วัดได้

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH/ABTS ที่วัดได้

$A_{\text{blank sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่วัดได้

IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % คำนวณได้จากสร้างกราฟสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารและ % Inhibition แทนค่าในสมการเส้นตรงโดยให้ค่า Y มีค่าเท่ากับ 50

TEAC คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox เทียบกับสารตัวอย่าง ถ้าค่าที่ได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐานถ้ามากกว่า 1 แสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารมาตรฐานในทางกลับกันถ้าน้อยกว่า 1 แสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าโดยหาได้จากสมการ

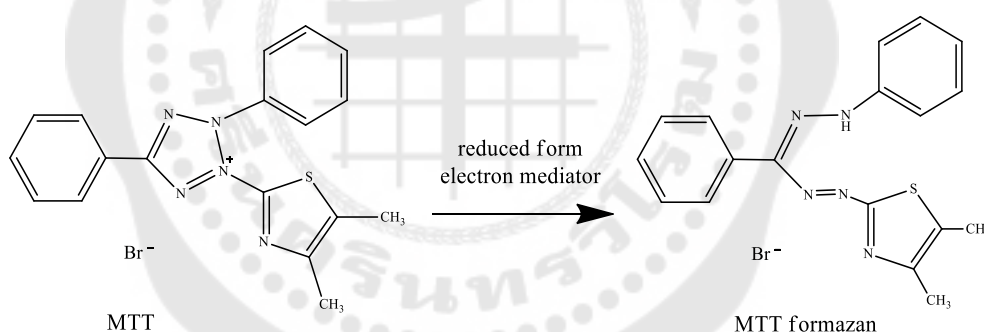
$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ trolox}}{IC_{50} \text{ sample}}$$

$IC_{50} \text{ sample}$ คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

IC_{50} trolox คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ด้วยวิธี MTT assay

MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นวิธีการที่ใช้ในการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ MTT assay เป็นสารสีที่ได้จากการสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt ในการทดสอบเพื่อดูการรอดชีวิตของเซลล์นั้นจะพิจารณาจากการเปลี่ยนสีให้เป็นสีม่วงน้ำเงินซึ่งเซลล์ที่รอดชีวิต metabolically active สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ทำให้เกิดปฏิกิริยา reduction เปลี่ยน MTT ไปเป็น formazan product เกิดผลึกของ formazan ให้สีม่วงน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 550-600 nm ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะแสดงให้เห็นถึงปริมาณของ formazan product ที่เกิดถ้าสีม่วงที่เกิดขึ้นเข้มมากก็แสดงว่ามีการเกิด formazan product มากแสดงให้เห็นว่ามีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากเช่นกันการเกิดปฏิกิริยาดังที่กล่าวมาแสดงในภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยน MTT ไปเป็น formazan product

จากที่กล่าวมาข้างต้น MTT assay จึงเป็นวิธีการที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อดูการรอดชีวิตของเซลล์ และเป็นวิธีการที่ให้ค่าการทดลองที่ถูกต้อง มีความสม่ำเสมอ และมีความแม่นยำและยังเป็นวิธีการที่มีราคาถูกเมื่อเทียบการทดสอบด้วยวิธีการอื่น ๆ เช่น MTS, XTT, AP, NR, CVDE, SRB เป็นต้น ดังนั้น MTT assay จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการใช้ทดสอบ การพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถพิจารณาได้จากการคำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ดังกล่าว (เบญจมาศ จิตรสมบุญ, 2010)

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (\% cell viability)} = \frac{\text{A550 sample}}{\text{A550 control}} \times 100$$

A550 sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบกับสารตัวอย่างที่มีความยาวคลื่น 550 nm

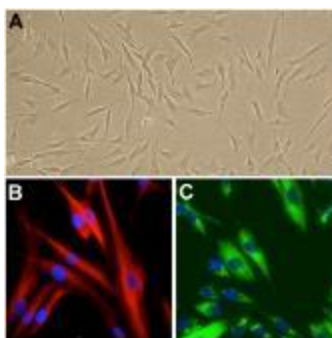
A550 control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความยาวคลื่น 550 nm

4.6. การทดสอบความสามารถในการสมานแผลโดยทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)

ปัจจุบันได้มีการนำความรู้ความสามารถด้านเซลล์วิทยา มาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยมากมายหลายด้านและส่วนใหญ่มักใช้กับงานวิจัยทางการแพทย์ ซึ่งเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ wound healing, cell migration และ invasion assay การทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เป็นวิธีการที่ใช้ในการจำลองสภาวะให้เทียบเคียงกับการเกิดแผลและการใช้สารที่สนใจในการทดสอบเพื่อดูประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลจากการเคลื่อนที่มาชิดกันของรอยขีด (Scratch) บนเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถคำนวณหาความสามารถในการสมานแผลโดยดูจากอัตราการความกว้างที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาที่ได้รับสารทดสอบจากสมการ

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (\%wound closure)} = \frac{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก} - \text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันถัดไป}}{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก}} \times 100$$

จากการศึกษาวิจัยผู้วิจัยต้องการที่จะพัฒนาตำรับสารผสมระหว่างควอเซทิน (quercetin) และเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) เพื่อช่วยในการรักษาบาดแผล ประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลจากการเคลื่อนที่มาชิดกันของรอยขีด (scratch) บนเซลล์เพาะเลี้ยงที่เรียกว่า Scratch assay ในการทดลองจึงเลือกใช้เซลล์ human dermal fibroblasts (HDFb) ดังภาพประกอบ 10 ในการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการผลิต เมทริกซ์นอกเซลล์ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนังและมีบทบาทสำคัญในการรักษาบาดแผล ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลของเซลล์เพาะเลี้ยงจึงเลือกใช้เซลล์ HDFb รวมไปถึงเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้เร็วจึงเป็นเซลล์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ (Cell Applications, 2018)



ภาพประกอบ 10 แสดง human dermal fibroblasts: HDF (A), immunolabeled for vimentin (red) (B) and stained for FSP (green) (C). nuclei are visualized with DAPI (B, C, blue).

ที่มา: (Cell Applications, 2018)

4.6.2 การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ฮีโมไซโตมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ในการนับจำนวนเซลล์ตัวเครื่องจะมีส่วนประกอบที่เป็นแผ่นแก้วสำหรับใส่สารตัวอย่างซึ่งแผ่นแก้วดังกล่าวจะมีช่องว่างหรือแอ่ง (chamber) สำหรับให้สารตัวอย่างใส่ลงไปได้ และจะมีตารางตารางหรือกริด (grids) ที่แบ่งไว้สำหรับนับจำนวนเซลล์ ดังแสดงในภาพประกอบ 11 และมีกระจกปิดสไลด์ตัวอย่างของเซลล์จะต้องบรรจุในปริมาณที่แน่นอนเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ที่อยู่ในช่องของเหลว ซึ่งในการนับจำนวนเซลล์ในแอ่ง (chamber) จะใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อขยายขนาดให้สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ ตารางจะมีหลายขนาดด้วยกัน เช่น ขนาด 1x1, 0.25x0.25, 0.25x0.20 และ 0.20x0.20 mm เป็นต้น หน่วยของเซลล์ที่นับได้นั้นจะเป็นหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการนับจำนวนเซลล์จะทำการสุ่มนับจำนวน 5 ช่อง ถ้าเซลล์อยู่ทับเส้นพอดีจะทำการนับโดยเลือกนับให้อยู่ในช่องบนหรือล่างซ้ายหรือขวาช่องใดช่องหนึ่งแต่จะไม่มีกรับซ้ำ การนับจำนวนเซลล์สามารถคำนวณได้จากสมการ (ดวงกมล เรืองงาม, 2557) (Dechawut, Nitat, Taweesak, & Phannika, 2558)

$$\text{ปริมาณเซลล์/มิลลิลิตร} = \frac{C \times D \times 1000}{A \times d \times F}$$

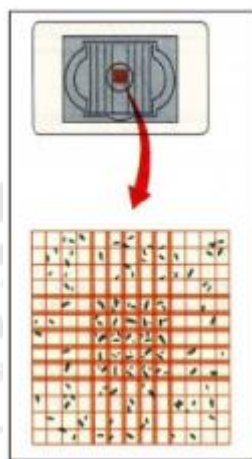
C คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้

A คือ พื้นที่ของ grids เท่ากับ 0.04 mm^2

d คือ ความลึกของพื้นที่ที่นับจำนวนเซลล์เท่ากับ 0.1 mm

F คือ จำนวนของช่องหรือตารางที่ทำการนับจำนวนเซลล์

D คือ ค่าการเจือจาง



ภาพประกอบ 11 ภาพด้านบนของแชมเบอร์สำหรับนับจำนวนเซลล์

ที่มา: (Dechawut et al., 2558)

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรช่วยสมานแผล

ฤทธิ์ของว่านหางจระเข้ในการสมานแผลผ่าตัด ก่อนการทดลองใช้ในคนได้มีการทดลองใช้ทดลองรักษาแผลผ่าตัด (surgical incision) ในหนูทดลองโดยพบว่าแผลสามารถหายได้เร็วกว่าปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าแผลมีขนาดเล็กลงเนื้อเยื่อผิวหนัง (re-epithelialization) เกิดกระบวนการซ่อมแซมและเจริญเติบโตสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ silver sulfadiazine หลังจากนั้นเมื่อนำครีมว่านหางจระเข้รักษาผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดริดสีดวงทวารโดยให้ทาครีมว่านหางจระเข้วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถทำให้แผลสมานได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ให้ทายาหลอกอาการเจ็บปวดจากบาดแผลก็ลดลงจึงมีส่วนช่วยในการลดการใช้ยาแก้ปวดกับผู้ป่วยกลุ่มนี้ (จันทร์พร ทองเอกแก้ว, 2556)

การศึกษาฤทธิ์ของบัวบก ขมิ้นชัน และวอลนัท ในรูปของ micro emulsion เจลรักษาโรคผิวหนังอักเสบในผู้ป่วยผิวหนังอักเสบ (eczema) จำนวน 360 คน ในรูปของ micro emulsion เจล

และ ointment เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยพบว่า micro emulsion gel ช่วยลดอาการคันได้ดี และ ointment สามารถลดอาการผิวหนังแห้งด้าน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก มีการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งที่ศีรษะ และคอจำนวน 50 คน ที่ต้องรับการรักษาด้วยการฉายแสง อายุระหว่าง 54.3 ± 9.86 ปี เพื่อลดอาการอักเสบที่เกิดจากการฉายแสงพบว่าในการทดลองมีการแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มและเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทาครีมที่มีส่วนผสมของน้ำมันโจโจ้บาและกลุ่มที่ทาครีมที่มีส่วนผสมของน้ำมันจากไม้จันทน์และขมิ้นชันในบริเวณที่ฉายแสงวันละ 5 ครั้ง (ก่อนฉายแสง 2 ชม. หลังฉายแสงเสร็จทันที หลังฉายแสง 2, 4, และ 6 ชม.) เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับครีมที่มีส่วนผสมของขมิ้นชันผิวหนังที่ฉายแสงช่วยลดการอักเสบของผิวหนังได้มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำมันโจโจ้บา (พินิตา ใหญ่ธรรมสาร, 2560)

การศึกษาฤทธิ์ของบัวบกในการเร่งการสร้างสารคอลลาเจน (Collagen synthesis enhancer) คอลลาเจนมีส่วนสำคัญกับผิวหนังมากเป็นเหมือนโครงสร้างของผิวหนังทำให้ผิวหนังเต่งตึง และช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับผิวหนัง ควบคู่ไปกับอีลาสติน (Elastin) ที่ช่วยสร้างความยืดหยุ่นให้กับผิวหนังและทำให้ไม่มีรอยเหี่ยวย่น ลดการอักเสบ รักษาบาดแผล จึงทดลองใช้สารสกัดจากใบบัวบกในการกระตุ้นให้แผลเกิดการสมานได้เร็วขึ้นจากการทรองนำครีมบัวบกเข้มข้น 0.2% ทาบริเวณภายนอกของแผลพบว่า เซลล์บาดแผลฟื้นฟูได้เร็วขึ้นจากการสร้างเส้นใยคอลลาเจน (Collagen synthesis) และเร่งการสร้างและซ่อมแซมเส้นเลือดที่เสียหาย (Angiogenesis) ให้กลับคืนมา จึงมีการนำบัวบกมาใช้ในการรักษาแผลในช่องปาก (จันทร์พร ทองเอกแก้ว, 2556)

การประเมินผลการต่อต้านอนุมูลอิสระและการรักษาบาดแผลของกะเม็ง (*Eclipta alba*) บัวบก (*Centella asiatica*) และเมื่อผสมสารสกัดพริกไทย (*Piper nigrum*) งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, Nitric oxide free radical scavenging activity, Superoxide scavenging activity และการสมานแผลในหนูขาวของสารสกัดจากกะเม็ง สารสกัดบัวบก สารสกัดกะเม็งผสมพริกไทย สารสกัดบัวบกผสมพริกไทย และส่วนประกอบของสารสกัดทั้งสามตัวทำการเตรียมตัวอย่างแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10 mg/mL พบว่าส่วนประกอบของสารสกัดทั้งสามตัวให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และสมานแผลได้ดีที่สุด (Patel, Rai, & Mishra, 2019)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
2. การเตรียมตัวอย่างสารในการวิจัย
3. การวิเคราะห์ทดสอบ
4. การวิเคราะห์ข้อมูล
5. วิธีการดำเนินการวิจัย และเก็บข้อมูล
6. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย และแผนการดำเนินการวิจัยตลอดโครงการ

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ

- autoclave (TOMY SX-500, Japan)
- CO₂ Incubator (New Brunswick, England)
- hot air oven (Wise Mix VM-10, Korea)
- HPLC-UV (YL, Korea)
- biosafety cabinet (Safe FAST Classic 212, Italy)
- micropipette (Proline, USA)
- microplate reader (Molecular Devices, USA)
- microscope (Nikon eclipse, Japan)
- multichannel pipettes (Proline, USA)
- pH meter (Eutech instruments, Singapore)
- ultrasonic bath (Hwashin, Korea)
- UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, USA)
- water bath (Mettler, Germany)
- zetasizer (DKSH, Thailand)

1.2 สารเคมี

- ABTS หรือ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
(Sigma, Canada)
- acetonitrile (HPLC grade) (LiChrosolv, Germany)
- agar (Merck, Germany)
- dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Unilab, Newzealand)
- DPPH (2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl) (Sigma, Germany)
- dulbecco' modified eagle medium (DMEM) (Corning, USA)
- absolute ethanol (EMSURE, Germany)
- fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)
- MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
(Gibco, USA)
- methanol (HPLC grade) (EMSURE, Germany)
- phosphoric acid (HPLC grade) (EMSURE, Germany)
- potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (Unilab, Newzealand)
- quercetin (Sigma, India)
- curcumin Purity (HPLC) \geq 65% (curcuminoids)
(Sigma, China)
- sodium pyruvate (Gibco, USA)
- trolox (Sigma, Russian)
- tryptic soy broth (TSB) (Bacto, USA)
- trypsin-EDTA 0.25% (Gibco, USA)
- neomycin (Sichu long march, China)
- tween 80 (Sigma, Japan)
- beeswax (Namsiang, Germany)
- lecithin (Namsiang, Germany)
- carbopol 940 (Namsiang, Germany)

1.3 จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

- *Staphylococcus aureus* DMST8013 (Department of Medical Sciences, Thailand)
- *Pseudomonas aeruginosa* DMST15501 (Department of Medical Sciences, Thailand)

2. การเตรียมตัวอย่างสารในการวิจัย

2.1 เตรียมตัวอย่างทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

เตรียมตัวอย่างสารละลาย quercetin และ curcuminoids ที่ละลายใน ethanol ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL เตรียมสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่ละลายใน ethanol ในอัตราส่วน 1:1, 3:1, 1:3 ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL

2.2 เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+)

เตรียมสารตัวอย่างสารละลาย quercetin และ curcuminoids ที่ละลายใน ethanol ที่ความเข้มข้น 3.125–100 µg/mL สำหรับวิเคราะห์ดีพีพีเอช (DPPH•)

เตรียมสารละลาย quercetin ที่ละลายใน ethanol เข้มข้น 3.125 - 50 µg/mL และสารละลาย curcuminoids ที่ละลายใน ethanol เข้มข้น 12.5-200 µg/mL สำหรับวิเคราะห์เอบีทีเอส (ABTS•+)

เตรียมตัวอย่างสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ใน ethanol ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ที่ความเข้มข้น 6.25-100 µg/mL

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.6 mM โดยการชั่ง DPPH มา 9.48 mg ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 40 mL ปรับปริมาตรด้วย ethanol จนครบ 40 mL จากนั้นหุ้มภาชนะด้วยฟอยล์อลูมิเนียมเพื่อป้องกันแสง

เตรียมสารละลาย positive control โดยใช้ trolox ละลายใน ethanol ที่ความเข้มข้น 3.125-150 µg/mL

เตรียมสารละลาย ABTS radical solution ที่ประกอบไปด้วยสารละลาย 7 mM ABTS ละลายในน้ำกลั่นและส่วนที่สองเตรียมสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ ละลายในน้ำกลั่นผสมส่วนที่หนึ่งและสองเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 1:1 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจือจางด้วย ethanol ในอัตราส่วน 1:19 (50 mL : 950 mL) แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

2.3 เตรียมตัวอย่างทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ด้วยวิธี

MTT assay

2.3.1 เตรียม stock quercetin และ stock curcuminoids ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยชั่ง 10 mg มาละลายใน DMSO 5 mL

2.3.2 นำ stock quercetin และ stock curcuminoids มาเตรียมสารละลาย quercetin และ curcuminoids ที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 10, 7.5 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ (DMSO สูงสุดเข้มข้น 1.25% v/v)

2.3.3 เตรียมสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ใน DMSO ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 10, 7.5 และ 5 $\mu\text{g/mL}$

2.4 เตรียมตัวอย่างทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)

2.4.1 เตรียม stock quercetin และ stock curcuminoids ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยชั่ง 10 mg มาละลายใน DMSO 5 mL

2.4.2 นำ stock quercetin และ stock curcuminoids มาเตรียมสารละลาย quercetin และ curcuminoids ที่ความเข้มข้น 7.5 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ (DMSO สูงสุดเข้มข้น 1.25% v/v)

2.4.3 เตรียมสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ใน DMSO ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ที่ความเข้มข้น 7.5 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ (DMSO สูงสุดเข้มข้น 1.25% v/v)

2.5 เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ HPLC-UV method

เตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเตรียม acetonitrile และ 0.1 % phosphoric acid กรองผ่านเยื่อแผ่นไนลอนขนาด 0.45 μm โดยใช้ชุดขวดแก้วใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum filter set) ในอัตราส่วน 4:6 (acetonitrile:0.1 % phosphoric acid)

เตรียมตัวอย่างสารผสมวิเคราะห์ด้วย UV-Vis spectrophotometer โดยการเตรียมสารละลาย quercetin และ curcuminoids ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ ใน ethanol แล้ว pipet มาอย่างละ 1 mL ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

เตรียมตัวอย่างสารผสมวิเคราะห์ HPLC โดยการเตรียม stock quercetin, stock curcuminoid ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ ใน ethanol และ stock SLN base ที่มีส่วนประกอบของ tween 80, beeswax, lecithin และ Carbopol 940 โดยการชั่งส่วนที่ละลายในน้ำคือ lecithin 22.8 mg, Carbopol 940 22.5 mg นำสารทั้งสองมาผสมกันแล้วละลายในน้ำกลั่น 20 mL หลังจากนั้นนำส่วนที่สองซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำคือ beeswax 36 mg ผสมกับ tween 80 1 mL และให้ความร้อนละลายให้เนื้อเดียวกันแล้วจึงเติม methanol 30 mL หลังจากนั้นผสมส่วนที่หนึ่ง

และส่วนที่สองใน volumetric flask ขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol นำ stock quercetin , stock curcuminoid และ stock SLN base ที่เตรียมไว้มาผสมกันที่มีความเข้มข้นของ quercetin และ curcuminoid เท่ากับ 2, 4, 8, 12, 16 และ 20 µg/mL โดยปรับปริมาตรด้วย methanol

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดสอบ การแยกโครมาโตแกรมใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ acetonitrile (HPLC grade ยี่ห้อ LiChrosolv):0.1 % phosphoric acid (AR grade ยี่ห้อ RCI Labscan) (40 %:60 % v/v) แบบสัดส่วนคงที่ตลอดการวิเคราะห์ (isocratic elution) ใช้คอลัมน์ ACE 5 C18-AR (150 mm×4.6mm ID.:5 mm) โดยใช้อัตราการไหลที่ 1.3 mL/minutes ที่อุณหภูมิ 35 °C และวัดผลที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร ปริมาตรที่ใช้ในการฉีดของสารแต่ละชนิดคือ 20 µl ระยะเวลาในการฉีดแต่ละเข็มเท่ากับ 20 นาที สารละลายและน้ำกลั่นถูกกรองผ่านเยื่อแผ่นไนลอนขนาด 0.45 µm โดยใช้ชุดขวดแก้วโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ HPLC รุ่น Vacuum degasser YL9100 Column compartment YL 9130 Temperature 4 °C (Cooling) – 90 °C

3. การวิเคราะห์ทดสอบ

3.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

3.1.1 วิธี disc diffusion method (ทำการทดสอบ n = 3, 3 ซ้ำ)

3.1.1.1 เลี้ยงเชื้อโดยเตรียมอาหาร tryptic soy broth (TSB) 5 mL ทำการ subculture เชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C จนครบ 18 ชั่วโมง

3.1.1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อละลาย agar ในอัตราส่วน TSB 3 g, agar 1.5 g และ ultrapure water 100 mL นำไป autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลง 50-60 °C เทลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish) รอให้อาหารเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องจะกลายเป็นอาหารแข็ง

3.1.1.3 หยดสารละลาย quercetin, curcuminoids, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids, positive control, negative control (solvent control) ปริมาตร 20 µl ลงบน paper disc แล้วรอจนตัวทำละลายแห้งจากนั้นวางบนอาหารที่มีการ spread เชื้อเตรียมไว้เพื่อทำการยับยั้งเชื้อ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C จนครบ 18 ชั่วโมง

3.1.1.4 วัดขนาด inhibition zone ที่เกิดขึ้นรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)

3.1.2 วิธี Broth dilution test (ทำการทดสอบ n = 3, 3 ซ้ำ)

3.1.2.1 เลี้ยงเชื้อโดยเตรียมอาหาร tryptic soy broth (TSB) 5 mL ทำการ subculture เชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C จนครบ 18 ชั่วโมง

3.1.2.2 หยดสารละลาย quercetin, curcuminoids, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids, positive control, negative control (solvent control) ที่แขวนตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 µl ลงใน well plate

3.1.2.3 หยดสารแขวนตะกอนของเชื้อ 5% v/v ในอาหารลงไป ใน well ปริมาตร 100 µl ที่มีสารทดสอบอยู่ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C จนครบ 18 ชั่วโมง

3.1.2.4 แปลผลจากหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดใสไม่ขุ่น โดยถือว่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (MIC)

3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+)

3.2.1 ขั้นตอนการทดสอบวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•)

3.2.1.1. เตรียมสารละลาย DPPH ใน ethanol ที่ความเข้มข้น 0.6 mM จากนั้นหุ้มภาชนะด้วยฟอยล์อลูมิเนียมเพื่อป้องกันแสง

3.2.1.2 ผสมสารละลายตัวอย่างสารละลาย quercetin, curcuminoids, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids, positive control และ Negative control 100 µl กับสารละลาย DPPH 100 µl ลงใน 96 well plate ทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทำเปรียบเทียบกับ blank และ positive control เติมสารต่าง ๆ

3.2.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.2.1.4 คำนวณหาค่า % Inhibition ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยค่า IC₅₀, TEAC

การคำนวณ % Inhibition

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่วัดได้

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH ที่วัดได้

$A_{\text{blank sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่วัดได้

IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % คำนวณได้จากสร้างกราฟสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารและ % Inhibition แทนค่าในสมการเส้นตรงโดยให้ค่า Y มีค่าเท่ากับ 50

TEAC คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox เทียบกับสารตัวอย่างถ้าค่าที่ได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐานถ้ามากกว่า 1 แสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารมาตรฐานในทางกลับกันถ้าน้อยกว่า 1 แสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า โดยหาได้จากสมการ

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ trolox}}{IC_{50} \text{ sample}}$$

$IC_{50} \text{ trolox}$ คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

$IC_{50} \text{ sample}$ คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

3.2.2 ขั้นตอนการทดสอบวิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+)

3.2.2.1 ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยเติมสารละลายตัวอย่าง quercetin, curcuminoids, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids, positive control และ negative control 20 μ l ลงใน 96 well plate และเติม ABTS radical solution 180 μ l

3.2.2.2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

3.2.2.3 ทำการทดลอง แต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ทำ 3 ซ้ำ โดยชนิดที่เติมชนิดสารและปริมาณสารที่ใส่ในแต่ละหลุม

3.2.2.4 ดูการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 735 nm

3.2.2.5. คำนวณหาค่า % Inhibition ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วย
ค่า IC₅₀, TEAC

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่วัดได้

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ ABTS ที่วัดได้

$A_{\text{blank sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่วัดได้

C_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % คำนวณได้จากสร้างกราฟสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารและ % Inhibition แทนค่าในสมการเส้นตรงโดยให้ค่า Y มีค่าเท่ากับ 50

TEAC คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox เทียบกับสารตัวอย่างถ้าค่าที่ได้มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าสารตัวอย่างมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐานถ้ามากกว่า 1 แสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารมาตรฐานในทางกลับกันถ้าน้อยกว่า 1 แสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า โดยหาได้จากสมการ

$$\text{TEAC} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ trolox}}{\text{IC}_{50} \text{ sample}}$$

$\text{IC}_{50} \text{ sample}$ คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

$\text{IC}_{50} \text{ trolox}$ คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

3.3.1.1 ชั่ง DMEM 3.7 g ผสมกับ Sodium bicarbonate 2.3 g ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 mL ละลายด้วย deionized water 990 mL

- 3.3.1.2 เติม penicillin-streptomycin solution ที่มี penicillin 10,000 U/mL และ streptomycin 10,000 µg/mL 10 mL
- 3.3.1.3 แบ่ง DMEM ที่เตรียมเป็น 500 mL และ 450 mL (450 mL สำหรับเติม FBS)
- 3.3.1.4 นำ DMEM มา 450 mL เติม FBS 50 mL (คิดเป็น 10 % ของปริมาตร)
- 3.3.1.5 นำไปกรองใน biohazard safety cabinet type II ด้วย sterile disposable filter units ด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 µm
- 3.3.2 การเตรียม phosphate buffer saline pH 7.4
- 3.3.2.1 นำ phosphate buffer saline tablet เข้มข้น 0.1 M จำนวน 5 เม็ด มาละลาย ด้วย deionized water 500 mL
- 3.3.2.2 นำไปกรองใน biohazard safety cabinet type II ด้วย sterile disposable filter units เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 µm
- 3.3.3 การ subculture cell
- 3.3.3.1 ใ้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในฟลาสต์ (flask) ออกล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline ปริมาตร 10 mL
- 3.3.3.2 เติม 0.25 % trypsin ปริมาตร 3 mL ลงไปในเซลล์บ่มไว้ใน 5 % CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที
- 3.3.3.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 mL เข้าไป และปิเปตใส่ centrifuge tube ขนาด 50 mL นับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer
- 3.3.3.4 หลังจากเติมอาหารเลี้ยงเซลล์นำเซลล์ใส่ลงไปในฟลาสต์ (flask) บ่มไว้ที่ 5 % CO₂ incubate ที่มีอุณหภูมิ 37 °C
- 3.3.3.5 เปลี่ยนอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันในช่วงแรก พอเซลล์เริ่มโตจะเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง และคอยสังเกตปริมาณของเซลล์ภายในฟลาสต์ (flask) เมื่อมีปริมาณเซลล์ 80 % จะทำการ subculture cell อีกครั้งเนื่องจากถ้าภายในฟลาสต์ (flask) มีปริมาณเซลล์มากเกินไปอาจทำให้เซลล์ที่เลี้ยงตายได้
- 3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity)
- 3.3.4.1 ใ้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในฟลาสต์ (flask) ออกล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline ปริมาตร 10 mL

3.3.4.2 เติม 0.25 % trypsin ปริมาตร 3 mL ลงไปในเซลล์บ่มไว้ใน 5 % CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที

3.3.4.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 mL เข้าไป และบีบใส่ centrifuge tube ขนาด 50 mL นับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

3.3.4.4 ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ 8,000 cells/mL

3.3.4.5 เติมเซลล์ลงไป 96 well plate ปริมาตร 100 µl ต่อหลุมทั้งหมด 96 หลุม นำไปบ่มไว้ใน 5 % CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเพลทเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไปเซลล์ ได้แก่ quercetin และ curcuminoids ใน DMSO ที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 10, 7.5 และ 5 µg/mL สารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ใน DMSO ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 10, 7.5 และ 5 µg/mL, DMSO 2.5 % อย่างละ 100 µl นำไปบ่มไว้ใน 5 % CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนครบ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเติม 3% hydrogen peroxide ปริมาตร 100 µl (negative control)

3.3.4.7 เมื่อครบ 24 ชั่วโมงบีบเปิดดูสารทดสอบออกเติมสารละลาย MTT ในเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 100 µl ลงไปทุกหลุม บ่มเซลล์ใน 5 % CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.4.8 ดูดสารละลาย MTT ออกแล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 µl เพื่อละลาย formazan จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดไมโครเพลท หลังจากนั้นทำการบ่มต่อใน medium เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดไมโครเพลททุกครั้ง

3.3.4.9. คำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (\% cell viability)} = \frac{\text{A550 sample}}{\text{A550 control}} \times 100$$

A550 sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบกับสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 550 nm

A550 control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความยาวคลื่น 550 nm

3.4 การทดสอบผลของเคอเซทิน (quercetin) และเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)

3.4.1 ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ด้วย phosphate buffer saline ปริมาตร 10 mL

3.4.2 เติม 0.25 % trypsin ปริมาตร 3 mL ลงไปในเซลล์บ่มไว้ใน 5% CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 นาที

3.4.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 mL และปิเปตใส่ centrifuge tube ขนาด 50 mL นับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

3.4.4 ปรับปริมาตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ 30,000 cells/mL

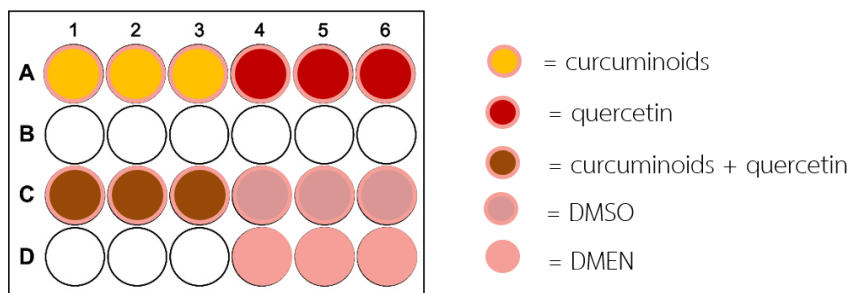
3.4.5 เติมเซลล์ลงใน 24 well plate ปริมาตร 500 µl ต่อหลุมนำไปบ่มใน 5% CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C จนเจริญเป็น monolayer

3.4.6 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก scratch cell โดยใช้ SPLScar™ Scratcher ชีตลงไปบริเวณตรงกลางทุกหลุม สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบรอยที่ scratch

3.4.7 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเพื่อล้างเศษของเซลล์ที่ลอยอยู่ด้านบนแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมลงไปปริมาตร 500 µl ต่อหลุม

3.4.8 ถ่ายภาพรอยขีดตรงกลางของแต่ละหลุมด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon eclipse)

3.4.9 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมออกเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไป quercetin, curcuminoids, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids, DMSO 2.5 % v/v, DMEM ดังในภาพประกอบที่ 12 หลุมละ 500 µl นำไปบ่ม 5% CO₂ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 12 แสดงการสารทดสอบใน 24 well plate

3.4.10 เมื่อครบเวลาถ่ายภาพเซลล์บริเวณที่ scratch ที่เวลา 24 ชั่วโมง

3.4.11 นำภาพที่ได้ไปวัดระยะห่างของเซลล์ด้วยโปรแกรม image J และนำไปคำนวณหาร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์จากสูตร

ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% wound closure) =

$$\frac{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก} - \text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันถัดไป}}{\text{พื้นที่ระยะห่างของเซลล์ในวันแรก}}$$

3.5 การทดสอบหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย UV-Vis spectrophotometer

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร เพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ HPLC

3.6 การทดสอบ HPLC-UV method

วิเคราะห์ system suitability test (SST) เป็นการทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้มีความสามารถในการแยก (resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) โดยการนำตัวอย่างสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่ความเข้มข้น 20 µg/mL ฉีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 6 ซ้ำ และหาเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ทั้งของพื้นที่พีค (peak area) และเวลาของสาร (t_R , Retention time) จากสมการ (กรกนก สุวรรณราช, 2018)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(Xi - (\bar{X}))^2}{n-1}}$$

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

ตาราง 2 แสดงเกณฑ์มาตรฐาน ICH guideline 2005 ของ System Suitability Test (SST)
(ICH Harmonised tripartite guideline, 2005) (Ravisankar, Navya, Pravallika, & Sri, 2015)

พารามิเตอร์	เกณฑ์มาตรฐาน USP
N (Number of theoretical plates)	> 2000
R (resolution)	>1.5
% RSD (Relative standard deviation)	<2% (n =6)
Peak symmetry	<2

ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and Range) นำตัวอย่างสารผสมความเข้มข้น 2, 4, 8, 12, 16 และ 20 µg/mL วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยการฉีดสารปริมาตร 20 µl ระยะเวลาในการฉีดแต่ละเข็มเท่ากับ 20 นาที เพื่อหาสมการเส้นตรงซึ่งต้องมีค่า R² ต้องไม่ต่ำกว่า 0.995 (AOAC guideline for single laboratory, 2002)

ขีดจำกัดการตรวจพบ (limits of detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (limits of quantification, LOQ) นำตัวอย่างสารผสมความเข้มข้น 2, 4, 8, 12, 16 และ 20 µg/mL วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยการฉีดสารปริมาตร 20 µl ฉีดติดต่อกัน 3 วัน ระยะเวลาในการฉีดแต่ละเข็มเท่ากับ 20 นาที เพื่อหาสมการเส้นตรงจำนวน 3 วันแล้วคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสมการ

$$\text{Limits of detection, LOD} \quad \text{LOD} = \frac{SD_{\text{intercept}} \times 3.3}{\bar{X}_{\text{slope}}}$$

$$\text{Limits of quantification, LOQ} \quad \text{LOQ} = \frac{SD_{\text{intercept}} \times 10}{\bar{X}_{\text{slope}}}$$

การทดสอบความถูกต้องของระบบ (accuracy) นำสารละลายผสมระหว่าง เควอเซทินและเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 4, 12 และ 20 $\mu\text{g/mL}$ ทดสอบซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่า % recovery อยู่ในช่วง 85-110% (AOAC guideline for single laboratory, 2002)

ทดสอบความเที่ยงตรง (precision) นำสารละลายผสมระหว่าง เควอเซทินและเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 4, 12 และ 20 $\mu\text{g/mL}$ ทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในวันเดียวกัน (intra-day) ทดสอบ 3 ครั้ง ติดต่อกัน 3 วัน (inter-day) เพื่อหาความเที่ยงตรง (precision) โดยพิจารณาจาก % RSD ไม่ควรเกิน 8%

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ใช้สถิติเชิงพรรณนาโดยวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ร้อยละ

4.2 ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics โดยใช้ one-way ANOVA ประเมินการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงปริมาณ p-value 0.05

4.3 การนำเสนอข้อมูลเป็นรูปภาพ แผนภูมิแท่ง กราฟเส้นและตาราง

5. วิธีการดำเนินการวิจัย และเก็บข้อมูล

ทำการดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ตำบลองครักษ์ อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผล และความเป็นพิษของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids เพื่อใช้กำหนดความเข้มข้นของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ในตำรับ และสามารถนำการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มี quercetin และ curcuminoids เป็นองค์ประกอบจึงทำการศึกษาวิจัยดังนี้

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)
 2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+)
 3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
 4. การทดสอบผลของ quercetin และ curcuminoids ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)
 5. การทดสอบ HPLC-UV method
- จากการทดลองได้ผลการทดลองดังนี้

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

จากการทดลองฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) ของสาร quercetin และ curcuminoids และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ซึ่งเป็นเชื้อที่พบในบาดแผลที่ทำให้บาดแผลเกิดการอักเสบและขัดขวางกระบวนการหายของบาดแผลด้วยวิธี disc diffusion method เพื่อให้ทราบว่าตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการต้านเชื้อทั้ง 2 ชนิดหรือไม่จากการทดลองได้ผลการทดลองดังนี้

จากตาราง 3 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ของ quercetin และ curcuminoids ที่ใช้ตัวทำละลายคือ ethanol โดยใช้ positive control คือ neomycin จากการทดลองพบว่า quercetin และ curcuminoids ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL ไม่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) เกิดขึ้นจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าสารทดสอบ quercetin และ curcuminoids ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

S. aureus DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับ negative control และมีผลแตกต่างกันกับ positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า curcumin (Sigma, USA) ที่ความเข้มข้น 219, 217 และ 175 $\mu\text{g/mL}$ มีความสามารถในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* (MSSA) ATCC 29213, *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เมื่อพิจารณาร่วมกับการทดลองในครั้งนี้พบว่าใช้ตัวทำละลายเดียวกันและความเข้มข้นจากงานวิจัยอ้างอิงใช้ความเข้มข้นของสารที่ต่ำกว่าแต่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ซึ่งไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองอาจสืบเนื่องมาจากการใช้เชื้อที่คนละสายพันธุ์กันซึ่งเชื้อที่ใช้ในการทดลองอาจเกิดการติดต่อกับ curcuminoids และพบว่าสารทดสอบที่ใช้มีแหล่งผลิตที่ต่างกันงานวิจัยอ้างอิงใช้ curcumin (Sigma, USA) ในขณะที่ผู้วิจัยใช้สารทดสอบในครั้งนี้คือ curcumin (curcuminoids) (Sigma, China) ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีผลต่อการยับยั้งเชื้อทั้งสองได้ (Hayati et al., 2013)

จากผลการทดลองในตาราง 4 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 เมื่อได้พิจารณาจากค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) พบว่าของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 8.78 ± 0.38 , 8.33 ± 0.33 และ 7.22 ± 0.19 mm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1 และ 3:1 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีใกล้เคียงกันซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และพบว่าที่อัตราส่วน 1:3 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้น้อยกว่าอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สารผสมที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* DMST 15501 โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 8.67 ± 0.00 , 7.67 ± 0.33 และ 7.06 ± 0.25 mm ตามลำดับ ที่อัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* (DMST 15501) ได้มากที่สุดแตกต่างกันกับอัตราส่วน 3:1 และ 1:3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ได้มากที่สุด จากค่าการต้านแบคทีเรียที่อ่านค่าได้จาก inhibition zone มีค่าน้อยกว่า 9 mm จึงไม่นิยมนำมาหาค่า MIC และอาจจะต้องมีการทดลองใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกว่านี้เพื่อให้มีค่า inhibition zone กับเชื้อทั้งสองชนิดได้มากขึ้น

ตาราง 3 แสดงค่าการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ของ quercetin และ curcuminoids

sample	Conc. µg/mL	<i>S. aureus</i> DMST 8013 (mm)				<i>P. aeruginosa</i> DMST 15501 (mm)			
		plate	plate	plate	ค่าเฉลี่ย	plate	plate	plate	ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	±SD	1	2	3	±SD
Q S	250	0	0	0	0	0	0	0	0
		16.00	17.00	16.00	16.33	12.00	13.00	13.00	12.67
					±0.58				±0.58
N		0	0	0	0	0	0	0	
C S	250	0	0	0	0	0	0	0	0
		16.00	15.00	15.00	15.33	12.00	12.00	13.00	12.33
					±0.58				±0.58
N		0	0	0	0	0	0	0	

Q=quercetin, C= curcuminoids, S= sample, P=positive control(neomycin), N=negative control (ethanol)

ตาราง 4 แสดงค่าการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ในอัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3

sample	Conc. µg/mL	<i>S. aureus</i> DMST 8013 (mm)				<i>P. aeruginosa</i> DMST 15501 (mm)				
		plate	plate	plate	ค่าเฉลี่ย	plate	plate	plate	ค่าเฉลี่ย	
		1	2	3	±SD	1	2	3	±SD	
Q:C	S	250	8.33	9.00	9.00	8.78	8.67	8.67	8.67	8.67
	(1:1)					±0.38				±0.00
	P	100	15.00	16.00	16.00	15.67	14.00	13.00	13.0	13.33
						±0.58			0	±0.58
	N		0	0	0	0	0	0	0	0
Q:C	S	250	8.67	8.33	8.00	8.33	7.67	7.33	8.00	7.67
	(3:1)					±0.33				±0.33
	P	100	14.00	15.00	15.00	14.67	12.00	13.00	13.0	12.67
						±0.58			0	±0.58
	N		0	0	0	0	0	0	0	0
Q:C	S	250	7.00	7.33	7.33	7.22	6.83	7.00	7.33	7.06
	(1:3)					±0.19				±0.25
	P	100	15.00	15.00	14.00	14.67	12.00	12.00	12.0	12.00
						±0.58			0	±0.00
	N		0	0	0	0	0	0	0	0

Q=quercetin, C= curcuminoids, S= Sample, P=positive control(neomycin), N=negative control (ethanol)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+)

จากการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+) ของ quercetin, curcuminoids และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 เมื่อทำการศึกษาทดสอบได้ผลดังนี้

2.1 ผลทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•)

จากการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) ของ quercetin, curcuminoids และสารละลายผสม quercetin และ curcuminoids ได้ผลการทดลองดังนี้

จากผลการทดลองในตาราง 5 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) ของ quercetin, curcuminoids, trolox, และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH•) พบว่าสารเดี่ยว quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.90 $\mu\text{g/mL}$ และ curcuminoids มีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.26 $\mu\text{g/mL}$ แสดงให้เห็นว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) ได้มากกว่า curcuminoids แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างทดสอบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่า quercetin และ curcuminoids มีค่า TEAC เท่ากับ 1.39 และ 0.49 ตามลำดับ จะเห็นว่า quercetin มีค่า TEAC มากกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox เมื่อพิจารณาสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.79, 18.96 และ 27.14 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมีค่าที่ใกล้เคียงกันและถือว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เนื่องจากมีอัตราส่วนของ quercetin เท่ากับและมากกว่า curcuminoids ในขณะเดียวกันที่อัตราส่วน 1:3 ที่มีอัตราส่วนของ quercetin น้อยกว่า curcuminoids จึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตาราง 5 แสดงค่า IC_{50} และค่า TEAC ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH•)

sample	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TEAC
quercetin	1.500	8.90	1.39
	3.125		
	6.250		
	12.500		
	25.000		

ตาราง 5 (ต่อ)

curcuminoids	3.125		
	6.250		
	12.500		
	25.000	25.26	0.49
	50.000		
Trolox	1.500		
	3.125		
	6.250		
	12.500	12.39	-
	25.000		
Q:C (1:1)	3.125		
	6.250		
	12.500		
	25.000	17.87	0.69
	30.000		
	50.000		
Q:C (3:1)	3.125		
	6.250		
	12.500		
	25.000	18.96	0.65
	30.000		
	50.000		

ตาราง 5 (ต่อ)

Q:C (1:3)	3.125		
	6.250		
	12.500		
	25.000	27.14	0.46
	30.000		
	50.000		

2.2 ผลทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+)

จากการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) ของ quercetin, curcuminoids และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ได้ผลการทดลองดังนี้

จากผลการทดลองในตาราง 6 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 พบว่า quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ curcuminoids มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แสดงให้เห็นว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) มากกว่า curcuminoids ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างทดสอบกับสารมาตรฐาน trolox พบว่า quercetin, curcuminoids มีค่า TEAC เท่ากับ 1.90 และ 1.20 ตามลำดับ จะเห็นว่า quercetin และ curcuminoids มีค่า TEAC มากกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน trolox เมื่อพิจารณาสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.40, 3.68 และ 5.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมีค่าที่ใกล้เคียงกันซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เนื่องจากมีอัตราส่วนของ quercetin เท่ากับและมากกว่า curcuminoids ในขณะเดียวกันที่อัตราส่วน 1:3 ที่มีอัตราส่วนของ quercetin น้อยกว่า curcuminoids จึงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+) และเอบีทีเอส (ABTS•+) ของ quercetin, curcuminoids และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลไปในทิศทางเดียวกันคือ quercetin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในขณะที่การใช้สารผสมอัตราส่วนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีคืออัตราส่วน 1:1 และ 3:1

ตาราง 6 แสดงค่า IC_{50} และค่า TEAC ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS•+)

sample	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	TEAC
quercetin	0.313	1.98	1.90
	0.625		
	1.250		
	2.500		
	5.000		
curcuminoids	1.250	3.13	1.20
	2.500		
	5.000		
	10.00		
	15.00		
trolox	1.250	3.75	-
	2.500		
	5.000		
	10.000		
	15.000		

ตาราง 6 (ต่อ)

Q:C 1:1	0.625		
	1.250		
	2.500		
	5.000	4.40	0.85
	6.000		
	10.00		
	Q:C 3:1	0.625	
	1.250		
	2.500		
	5.000	3.68	1.02
	6.000		
	10.000		
Q:C 1:3	0.625		
	1.250		
	2.500		
	5.000	5.22	0.72
	6.000		
	10.00		

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ด้วยวิธี MTT assay ต่อเซลล์ (HDFb)

จากการศึกษาความเป็นพิษของของสารละลาย quercetin, curcuminoids และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ต่อเซลล์ HDFb ด้วยวิธี MTT assay ได้ผลการทดลองดังนี้

จากตาราง 7 และภาพประกอบ 13 เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตร้อยละ 50 พบว่าเมื่อบ่มสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า quercetin ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้เนื่องจากที่ 25 $\mu\text{g/mL}$ เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) มากกว่า 50 % จึงแสดงให้เห็นว่า quercetin เป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นดังกล่าว และเมื่อเรียงลำดับความเข้มข้นของสารทดสอบจากค่า IC_{50} โดยเรียงลำดับจากน้อยซึ่งมีความเป็นพิษสูงไปมากซึ่งมีความเป็นพิษต่ำได้ดังนี้ สารละลายผสม quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:3, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:1, curcuminoids, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 3:1, สารละลาย quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.24, 12.6, 14.57, 24.78, N/A และ N/A ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสารเดี่ยวที่ทำการทดสอบพบว่า curcuminoids มีค่า IC_{50} น้อยกว่า quercetin แสดงให้เห็นว่า curcuminoids มีความเป็นพิษมากกว่า เมื่อพิจารณาสารผสมพบว่าการใช้อัตราส่วนที่มีความเข้มข้นของ curcuminoids สูงกว่าจะมีความเป็นพิษสูงเช่นเดียวกันซึ่งเรียงลำดับความเข้มข้นสูงไปต่ำได้ดังนี้ สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:3, 1:1 และ 3:1 ตามลำดับ และเมื่อทำการทดลองเพื่อดูผลการรอดชีวิตของเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วันที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนำสารทดสอบออกและบ่มเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 และ 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบในตาราง 7 ภาพประกอบ 13 พบว่าปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} ลดลงตามลำดับแสดงว่าสารทดสอบอาจมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ตั้งแต่ 80% ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าดังนี้ quercetin ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$ มี % cell viability เท่ากับ $84.59 \pm 2.85\%$ แต่จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ มีผลการทดลองที่น่าสนใจคือ % cell viability เท่ากับ 79.49 ± 3.02 ที่มีค่าความคลาดเคลื่อน (SD) 3.02 ดังนั้นจึงอาจมีค่าเท่ากับ 82.51 % จึงพิจารณาที่ 12.5 $\mu\text{g/mL}$, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 3:1 ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$, curcuminoids ที่ความเข้มข้น 7.5 $\mu\text{g/mL}$, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:1 เข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$ และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:3 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$ โดยพบว่ามีค่า % cell viability เท่ากับ 84.59 ± 2.85 , 83.04 ± 4.69 , 98.44 ± 2.29 ,

101.86±2.71 และ 88.59±4.24% ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นที่กล่าวมาถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HDFb

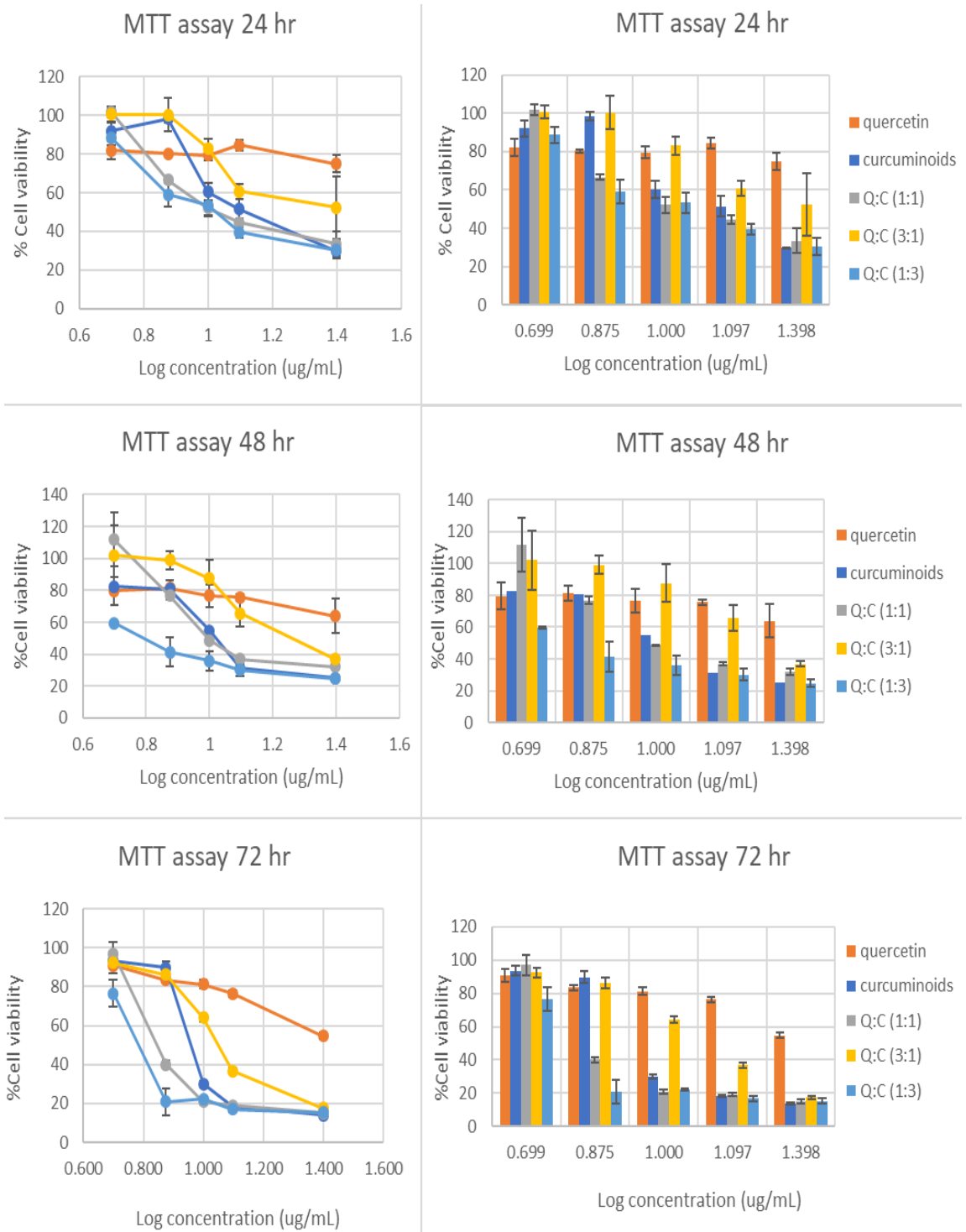


ตาราง 7 แสดง % cell viability และ IC₅₀ ของ quercetin, curcuminoids และสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

sample	Conc. (µg/ml)	Conc. (log)	24 hr.		48 hr.		72 hr.	
			% cell viability ±SD	IC ₅₀ (µg/ml)	% cell viability ± SD	IC ₅₀ (µg/ml)	% cell viability ±SD	IC ₅₀ (µg/ml)
quercetin	5.000	0.699	81.98±4.53		79.62±8.72		90.96±3.84	
	7.500	0.875	80.37±0.89		81.41±4.85		83.41±1.53	
	10.000	1.000	79.49±3.02	N/A	76.57±7.24	N/A	81.24±2.30	N/A
	12.500	1.097	84.59±2.85		75.58±1.67		76.37±1.70	
	25.000	1.398	75.02±4.44		63.99±10.58		54.76±1.81	
curcuminoids	5.000	0.699	92.06±4.20		82.47±3.06		93.42±3.02	
	7.500	0.875	98.44±2.29		80.74±5.79		89.67±3.40	
	10.000	1.000	60.40±4.57	14.57	54.86±3.55	11.11	29.89±1.47	9.3
	12.500	1.097	51.48±5.26		31.04±1.50		18.52±0.74	
	25.000	1.398	29.77±0.29		25.09±1.30		13.84±0.39	
Q:C (1:1)	5.000	0.699	101.86±2.71		111.92±16.83		97.00±6.09	
	7.500	0.875	66.67±1.41		76.71±2.29		40.02±1.85	
	10.000	1.000	52.13±4.05	12.6	48.69±0.20	11.52	20.90±1.30	7.437
	12.500	1.097	44.65±2.19		36.89±1.26		19.07±1.04	
	25.000	1.398	33.51±6.63		32.07±2.09		15.15±1.14	

ตาราง 7 (ต่อ)

sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. (log)	24 hr.		48 hr.		72 hr.	
			% cell viability \pm SD	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	% cell viability \pm SD	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	% cell viability \pm SD	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Q:C (3:1)	5.000	0.699	100.51 \pm 3.42		102.05 \pm 18.66		92.38 \pm 2.66	
	7.500	0.875	100.34 \pm 8.63		98.96 \pm 5.78		86.32 \pm 3.18	
	10.000	1.000	83.04 \pm 4.69	24.78	87.67 \pm 11.74	19.22	64.01 \pm 1.98	11.69
	12.500	1.097	71.45 \pm 3.92		65.55 \pm 8.00		36.77 \pm 1.50	
	25.000	1.398	52.30 \pm 16.27		36.83 \pm 1.67		17.56 \pm 0.93	
Q:C (1:3)	5.000	0.699	88.59 \pm 4.24	11.24	59.62 \pm 0.71	6.694	76.45 \pm 6.91	
	7.500	0.875	59.13 \pm 6.39		41.39 \pm 9.35		20.85 \pm 6.87	
	10.000	1.000	53.35 \pm 5.39		35.83 \pm 6.06		22.31 \pm 0.72	6.27
	12.500	1.097	39.45 \pm 2.94		29.99 \pm 3.78		16.91 \pm 1.56	
	25.000	1.398	30.44 \pm 4.35		79.62 \pm 2.13		15.40 \pm 1.36	



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดง % cell viability ของ quercetin, curcuminoids และสารผสม ระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

4. ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ (scratch assay)

จากการศึกษาความสามารถในการสมานแผลโดยพิจารณาจากการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Scratch assay) ของ quercetin, curcuminoids และสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ต่อเซลล์ human dermal fibroblast (HDFb) ได้ผลการทดลองดังนี้

จากตาราง 8 แสดงผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อดูประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลจากการเคลื่อนที่มาชิดกันของรอยขีด (Scratch) บนเซลล์เพาะเลี้ยง HDFb โดยคำนวณหาความสามารถในการสมานแผลจากอัตราการความกว้างที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาที่ได้รับสารทดสอบซึ่งแสดงเป็นค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% wound closure) หลังเติมสารทดสอบลงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 7.5 µg/mL พบว่าสารละลาย quercetin มี % wound closure เท่ากับ 48.10 ± 5.12 % ซึ่งมีค่ามากที่สุดรองลงมาคือสารละลายผสม quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 3:1 มีค่าเท่ากับ 44.70 ± 8.15 % , สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:1 มีค่าเท่ากับ 37.89 ± 2.64 % , สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:3 มีค่าเท่ากับ 31.71 ± 4.12 % , curcuminoids มีค่าเท่ากับ 21.37 ± 5.44 % พิจารณาจากข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำ % wound closure ของสารทดสอบมาพิจารณาร่วมกับ control (DMSO 1.25% v/v) จะเห็นได้ชัดว่าสารทดสอบที่มีส่วนช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ HDFb คือ quercetin, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 3:1, สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารผสมที่มีอัตราส่วนของ quercetin สูงกว่ามีส่วนช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้มากกว่า

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบ Scratch assay ร่วมกับ MTT assay พบว่าทั้งสองการทดสอบมีผลไปในทิศทางเดียวกันเนื่องจาก curcuminoids มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า quercetin ดังนั้นการใช้ quercetin ที่ความเข้มข้น 7.5 µg/mL จึงมีส่วนช่วยให้เซลล์เคลื่อนที่เข้าหากันได้มากกว่าสารทดสอบอื่น ๆ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตาราง 8 แสดงผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง โดยแสดงเป็นค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (% wound closure)

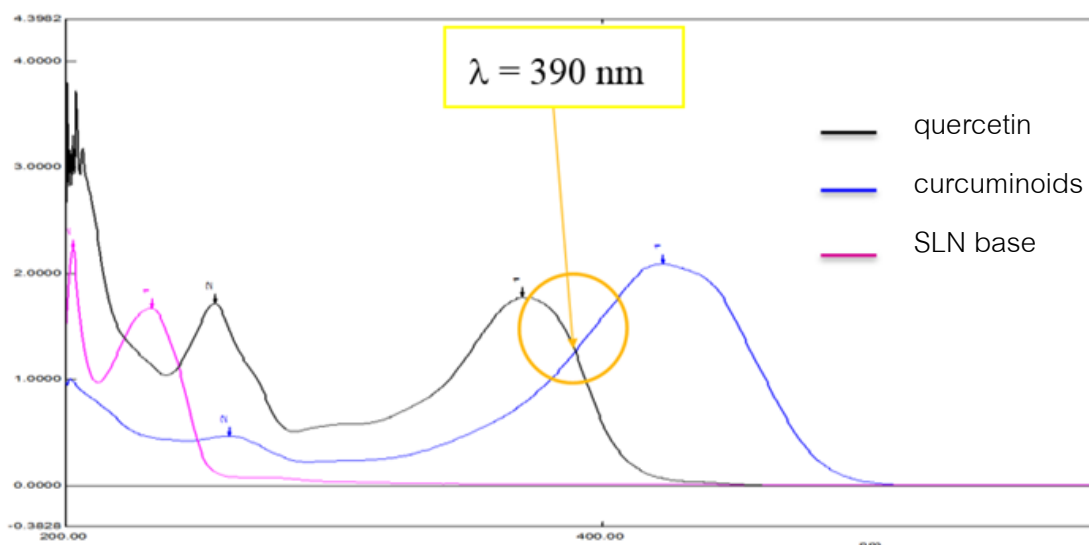
sample	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	% wound closure 24 hr.
		Avg. \pm SD
quercetin	7.5	48.10 \pm 5.12
curcuminoids	7.5	21.37 \pm 5.44
Q:C (1:1)	7.5	37.89 \pm 2.64
Q:C (3:1)	7.5	44.70 \pm 8.15
Q:C (1:3)	7.5	31.71 \pm 4.12
control (DMSO)	1.25%	34.84 \pm 2.29

5. ผลการทดลองเพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV method

จากการศึกษาวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารละลายผสมผสม quercetin และ curcuminoids จึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมเมื่อนำสารผสมดังกล่าวมาพัฒนาเป็นตำรับนาโนเจลระบบไฮลิโพลิไดนาโนพาร์ติเคิลด้วยเทคนิค HPLC-UV จากการนำวัสดุดิบที่เป็นส่วนประกอบมาผสมกันเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

5.1 การทดลองเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV – Vis spectrophotometer

จากการทดลองเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์พบว่าเมื่อนำ quercetin, curcuminoids และ SLN base ไปวิเคราะห์เพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมด้วยเครื่อง UV – Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 800-200 nm จากผลการวิเคราะห์พบว่า quercetin, curcuminoids และ SLN base ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370, 423 และ 232 nm ตามลำดับและพบว่าความยาวคลื่นที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-UV method คือ 390 nm เพราะเป็นจุดที่มีความยาวคลื่นของ quercetin และ curcuminoids มาซ้อนทับกันพอดีและไม่มีการรบกวนจากความยาวคลื่นของ SLN base ดังแสดงในภาพประกอบ



ภาพประกอบ 14 แสดง UV spectrum ของ quercetin, curcuminoids และ SLN base

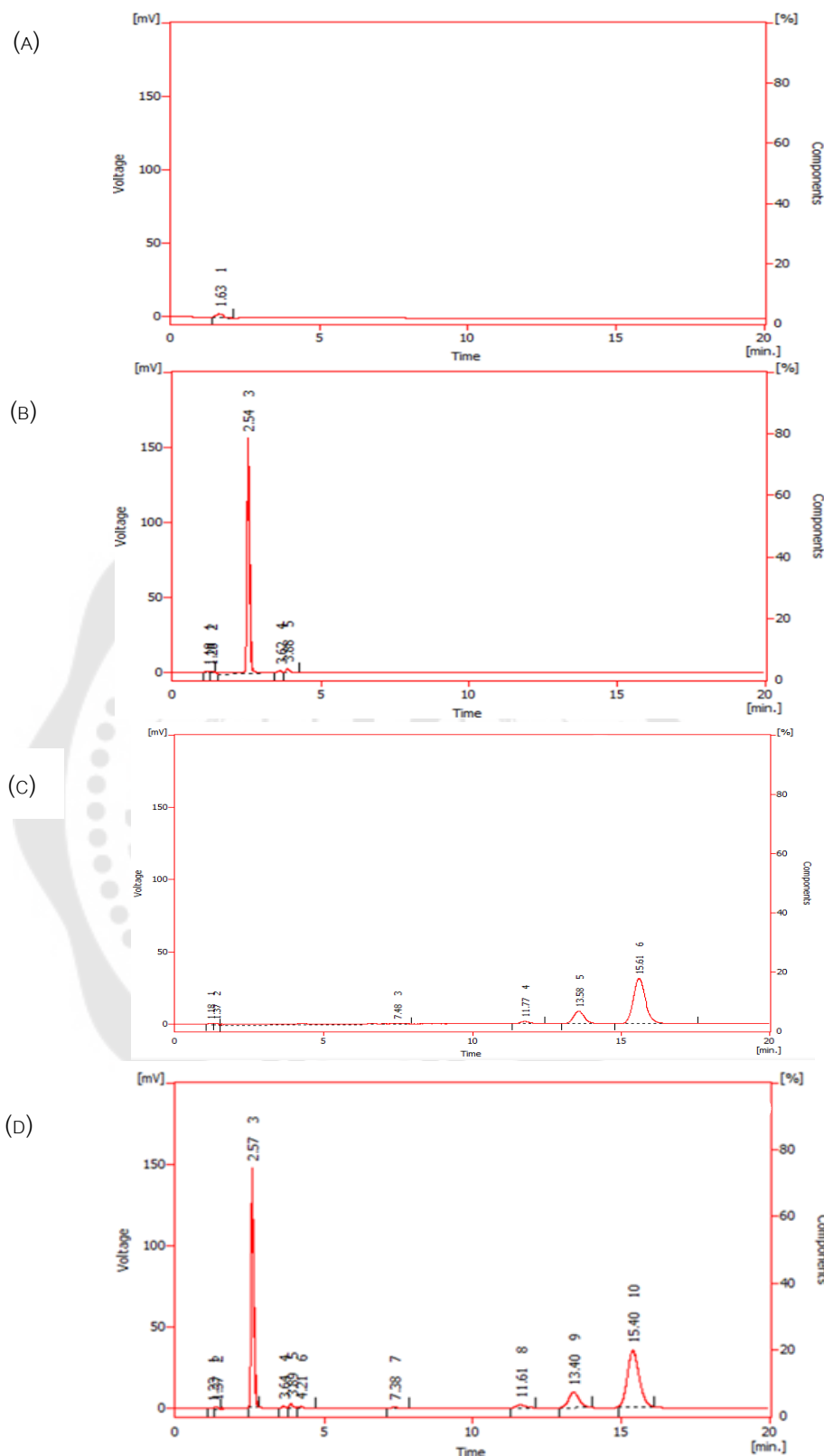
5.2 วิเคราะห์ HPLC-UV method

System Suitability Test (SST)

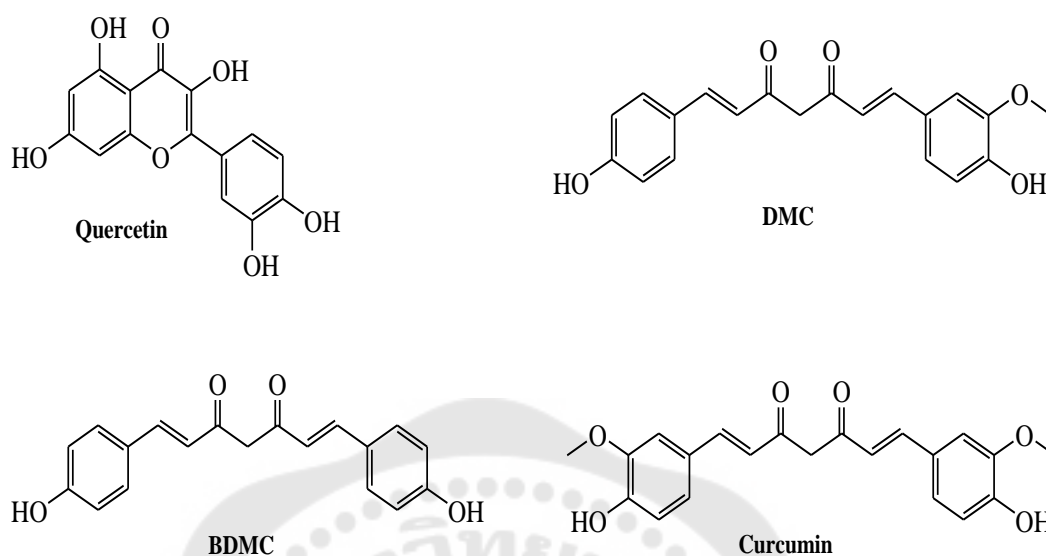
จากการทดสอบความสามารถในการแยกของ HPLC ในการวิเคราะห์สารผสม quercetin, curcuminoids และ SLN base ที่ความยาวคลื่น 390 nm โดยใช้ HPLC-UV method เพื่อพิสูจน์ว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้มีความสามารถในการแยก (resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) โดยฉีดตัวอย่างสารผสมที่มีความเข้มข้น 20 µg/mL พบว่า retention time ของ quercetin มีค่าเท่ากับ 2.54 นาที และ curcuminoids มีพีคเกิดขึ้น 3 พีคที่ประกอบด้วย BDMC, DMC และ curcumin โดยมี retention time ดังนี้ 11.77, 13.58 และ 15.61 นาที ตามลำดับจากผลดังกล่าวใช้ retention time น้อยลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่อ้างอิง (Lee, Mun, Yvonne, Peh, & Yusrida, 2014) ที่มี retention times ของ quercetin มีค่าเท่ากับ 3.97 นาที, curcuminoids ที่ประกอบด้วย BDMC, DMC และ curcumin มี retention time เท่ากับ 13.84, 15.23 และ 16.72 นาที ตามลำดับอาจเนื่องมาจากการวิจัยครั้งนี้ใช้ mobile phases ที่แตกต่างกันและคอลัมน์ที่สั้นกว่าจึงทำให้มี retention time ที่น้อยกว่าและลักษณะพีคของสารทดสอบสามารถแยกจากกันชัดเจนและมีลักษณะ shape ดังแสดงในภาพประกอบ 15 แสดงให้เห็นว่าเป็นระบบที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ quercetin และ curcuminoids (ประกอบด้วย BDMC, DMC, curcumin) ตามภาพประกอบ 16 ที่ใช้ระบบโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ (reversed phase chromatography) และเลือกใช้ mobile phases คือ acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid (40 : 60 % v/v) แบบ isocratic elution ที่เป็นการใช้สัดส่วน mobile phase คงที่ตลอดการวิเคราะห์มี pH ประมาณ 2.8-3 ซึ่งมีความเป็นกรดและเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่าง quercetin และ curcuminoids เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมและไม่ทำให้โครงสร้างของสารเกิดการแตกตัว เมื่อพิจารณาค่า retention time พบว่า quercetin เป็นสารที่มีความมีขั้วสูงจึงมี retention time สั้นในทางตรงกันข้าม curcuminoids มีความมีขั้วต่ำจึงมี retention time ที่ยาวนานกว่า





ภาพประกอบ 15 แสดงโครมาโทแกรมของ SLN base (A), quercetin (B), curcuminoids (C) และสารผสม quercetin และ curcuminoids ใน SLN base (D)



ภาพประกอบ 16 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin และ curcuminoids (ประกอบด้วย BDMC, DMC, curcumin)

ที่มา: (modified from (Lee et al., 2014))

เมื่อพิจารณาค่า system suitability test (SST) ตามข้อกำหนด ICH guideline, 2005 ในตาราง 9 เปรียบเทียบกับผลการทดลองในตาราง 10 จะเห็นว่า quercetin และ curcuminoids มีพื้นที่พีค (peak area) ที่มี % RSD ค่าเท่ากับ 0.80 และ 0.58% ตามลำดับ และเวลาของสาร (t_R , retention time) มี % RSD เท่ากับ 0.13 และ 0.15% ตามลำดับ ที่ $n = 6$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 ส่วน theoretical plate number ของ quercetin และ curcuminoids มีค่าเท่ากับ 4273.33 และ 7443.667 ตามลำดับซึ่งมากกว่า 1000 ค่า resolution มีค่าเท่ากับ 5.03 และ 2.97 เมื่อเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานมีค่ามากกว่า 1.5 และค่า peak symmetry มีค่าเท่ากับ 1.23 และ 1.16 ตามลำดับซึ่งน้อยกว่า 2 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV method มีความสามารถในการแยกที่ดีพีคแยกออกจากกันชัดเจนและมีลักษณะ peak sharp และการวิเคราะห์มีความเหมาะสมเป็นไปตามข้อกำหนด ICH guideline, 2005

ตาราง 9 แสดงเกณฑ์มาตรฐาน ICH guideline 2005 ของ System Suitability Test (SST)
(ICH Harmonised tripartite guideline, 2005) (Ravisankar et al., 2015)

Parameters	Standard specification
N (Number of theoretical plates)	> 2000
R (resolution)	> 1.5
% RSD (Relative standard deviation)	< 2% (n =6)
Peak symmetry	< 2

ตาราง 10 แสดงค่า Retention time, Peak area, Theoretical plate number, resolution, %RSD, Peak symmetry ของ quercetin และ curcuminoids (ประกอบด้วย BDMC, DMC และ curcumin)

quercetin					
ครั้งที่	retention time	peak area	theoretical plate number	resolution	peak symmetry
x	2.59	750.35	4273.33	5.03	1.23
SD	0.00	5.99	11.36	0.05	0.02
%RSD	0.13	0.80			
BDMC					
ครั้งที่	retention time	peak area	Theoretical plate number	resolution	Peak symmetry
x	11.77	36.56	6422.67	8.35	1.27
SD	0.01	0.33	72.09	0.14	0.02
%RSD	0.12	0.91			

ตาราง 10 (ต่อ)

DMC					
ครั้งที่	retention time	peak area	Theoretical plate number	resolution	Peak symmetry
x	13.57	217.73	7085.83	2.94	1.18
SD	0.02	1.91	104.08	0.03	0.01
%RSD	0.12	0.88			
curcumin					
ครั้งที่	retention time	peak area	Theoretical plate number	resolution	Peak symmetry
x	15.60	885.72	7443.67	2.97	1.16
SD	0.02	5.13	63.12	0.02	0.00
%RSD	0.15	0.58			

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (Linear calibration curves)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารผสม quercetin และ curcuminoids และ SLN base ที่ความเข้มข้น 2, 4, 8, 12, 16 และ 20 $\mu\text{g/mL}$ ทำการฉีดซ้ำจำนวน 3 วัน แล้วนำมาสร้างกราฟสมการเส้นตรงเพื่อหาค่า R^2 โดยได้ค่า R^2 ของ quercetin ในวันที่ 1, 2, 3 เท่ากับ 0.9962 curcuminoids ในวันที่ 1, 2, 3 ที่ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin มีค่าเท่ากับ 0.9969, 0.9987, และ 0.9991 ตามลำดับดังแสดงในตาราง 11 สมการเส้นตรงมีค่า R^2 มีไม่ต่ำกว่า 0.9950 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นเส้นตรงที่ดี

ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limits of detection, LOD) และขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limits of quantification, LOQ)

ประเมินความไวของวิธีการทดสอบโดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างสารผสม (LOD) กับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างโดยมีความแม่นยำและความเที่ยงตามที่กำหนด (LOQ) จากการทดลองเมื่อพิจารณาจากสมการเส้นตรงทั้ง 3 วันของ quercetin และ curcuminoids ใน solid lipid nanoparticles (SLN) ผลที่ได้แสดงในตาราง 12 ซึ่งพบว่ามีค่า LOD ของ quercetin เท่ากับ 0.162 µg/mL และ curcuminoids ที่ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin มีค่าเท่ากับ 0.021, 0.172 และ 0.464 µg/mL ตามลำดับ ส่วนค่า LOQ ของ quercetin มีค่าเท่ากับ 0.490 และ curcuminoids ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin มีค่าเท่ากับ 0.064, 0.522 และ 1.406 µg/mL ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความเหมาะสม

ตาราง 12 แสดงค่า LOD, LOQ ของสารสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids (ประกอบไปด้วย BDMC, DMC และ curcumin)

sample	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
quercetin	0.162	0.490
curcuminoids		
BDMC	0.021	0.064
DMC	0.172	0.522
curcumin	0.464	1.406

ทดสอบความแม่นยำของระบบ (Accuracy) และความเที่ยงตรง (Precision)

ความถูกต้องของระบบ (Accuracy) หรือการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จากผลที่ได้แสดงในตาราง 13 พบว่ามีค่า % recovery ของ quercetin ในวันเดียวกัน (intra day) ที่ความเข้มข้น 4, 12 และ 20 µg/mL วันที่ 1 มีค่าเท่ากับ 102.47, 91.97 และ 101.96 % ตามลำดับ วันที่ 2 มีค่าเท่ากับ 102.96, 92.98 และ 104.12% ตามลำดับ วันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 99.42, 94.62 และ 110.02 % ตามลำดับ และ curcuminoids ที่ความเข้มข้น 4, 12 และ 20

$\mu\text{g/mL}$ มีค่า % recovery วันที่ 1 มีค่าระหว่าง 91.97-102.47% วันที่ 2 มีค่าระหว่าง 92.98-105.86 % ตามลำดับ วันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 93.73-110.02 % ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 85-110 % ซึ่งถือว่าระบบที่ใช้มีความถูกต้อง

ความแม่นยำ (Precision) เมื่อพิจารณาจาก quercetin ความเข้มข้น 4,12 และ 20 $\mu\text{g/mL}$ ในวันเดียวกัน (intra-day) %RSD วันที่ 1 มีค่าระหว่าง 0.02–0.42 % วันที่ 2 มีค่าระหว่าง 0.03–0.51 % วันที่ 3 มีค่าระหว่าง 0.41–4.88 % เมื่อพิจารณาระหว่างวัน (inter-day) มีค่า %RSD ระหว่าง 1.28-3.62 % curcuminoids ที่ความเข้มข้นเดียวกันผลการทดลองในวันเดียวกัน (intra-day) วันที่ 1 มีค่าระหว่าง 0.1–1.85 % วันที่ 2 มีค่าระหว่าง 0.03–0.58 % วันที่ 3 มีค่าระหว่าง 0.95–4.09 % เมื่อพิจารณาระหว่างวัน (inter-day) มีค่า %RSD ระหว่าง 1.07-6.87% ซึ่งยังไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานคือ 8% จึงถือว่ามีความแม่นยำของการวิเคราะห์

จากผลการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids พบว่าการใช้สารผสมจะให้ประสิทธิภาพครอบคลุมฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผล ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารผสมเป็นตำรับนาโนเจลระบบไฮลิดิลิพิดนาโนพาร์ติเคิลเพื่อใช้รักษาบาดแผลการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์สารผสมในตำรับนาโนเจลที่คาดว่าจะพัฒนาขึ้นในอนาคตในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยนำสาร quercetin, curcuminoids และ SLN base มาผสมกันโดยยังไม่ได้มีการเตรียมเป็นตำรับแล้วทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-UV method จากผลการทดลองพบว่าเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ quercetin และ curcuminoids ในสูตร SLN โดยใช้เวลาวิเคราะห์ที่ 390 นาโนเมตรสารทั้งสองชนิดสามารถแยกจากกันได้อย่างชัดเจนและไม่มีการรบกวนจาก SLN base จึงบอกได้ว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความสามารถในการแยกได้ดีตามหลักเกณฑ์ ICH guideline 2005 มีความถูกต้องของระบบและความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์สอดคล้องกับ AOAC guideline 2002 จึงถือว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารผสมของ quercetin และ curcuminoids เมื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปของ SLN

ตาราง 13 แสดงค่า % recovery และ %RSD ของ quercetin และ curcuminoids ภายในวันเดียวกัน (intra day) และระหว่างวัน (inter day)

Sample	Conc. (µg/mL)	Inter-day											
		Intra-day			Day1			Day2			Day3		
		%recovery	%RSD	%recovery	%RSD	%recovery	%RSD	%recovery	%RSD	%recovery	%RSD	%recovery	%RSD
quercetin	4	101.19	3.59	102.47	0.19	102.96	0.03	99.42	4.88				
	12	93.19	1.28	91.97	0.42	92.98	0.03	94.62	0.41				
	20	105.36	3.62	101.96	0.02	104.12	0.51	110.02	2.20				
curcuminoids													
BDMC	4	101.18	6.87	100.29	1.80	109.53	0.58	93.73	1.59				
	12	100.55	3.13	101.76	1.80	102.74	0.27	97.13	3.11				
	20	102.40	5.73	97.64	1.05	110.06	0.28	99.51	1.48				
DMC	4	101.52	3.26	102.79	0.36	97.51	0.12	104.25	2.32				
	12	101.14	1.07	100.53	0.11	100.47	0.06	102.42	0.95				
	20	103.00	2.22	102.06	0.71	105.66	0.45	101.27	1.89				
curcumin	4	100.31	2.15	101.17	0.32	99.70	0.04	100.07	4.09				
	12	99.57	1.38	98.74	0.73	98.76	0.03	101.21	1.00				
	20	103.81	2.02	102.16	1.85	105.86	0.09	103.41	1.80				

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยพัฒนาตำรับสารผสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผล โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับการสมานแผล ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผล และความเป็นพิษของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids เพื่อใช้กำหนดความเข้มข้นของสารผสมในตำรับ รวมไปถึงการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids เป็นองค์ประกอบ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ quercetin และ curcuminoids พบว่า สารเดี่ยวที่ความเข้มข้น 250 µg/mL ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 แต่เมื่อทำการทดสอบสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ที่อัตราส่วน 1:1 และ 3:1 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีใกล้เคียงกันและไม่มี ความแตกต่าง (p>0.05) ที่อัตราส่วน 1:3 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้น้อยที่สุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้สารผสมช่วยเสริมฤทธิ์กันจึงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่ทำให้แผลเกิดการอักเสบในขณะที่สารเดี่ยวไม่มี จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า curcumin นำไปผสมในยาปฏิชีวนะ tetracycline เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ในหนูทดลองพบว่าการใช้ curcumin ร่วมกับยาปฏิชีวนะทำให้เสริมฤทธิ์กันและต้านแบคทีเรียดังกล่าวได้ดีและสามารถลดปริมาณการใช้ยาได้ (Sukandar, Kurniati, Puspatriani, & Hanung, 2017) และเมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และเอบีทีเอส (ABTS•+) พบว่าผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือสารเดี่ยว quercetin เป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า curcuminoids เมื่อเปรียบเทียบ quercetin และ curcuminoids กับสารมาตรฐาน trolox พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) เมื่อพิจารณาที่สารผสมอัตราส่วนที่มี quercetin มากกว่าหรือเท่ากับจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าดังนั้นพบว่าการผสมที่อัตราส่วน 1:1 และ 3:1 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดในการต้าน

อนุมูลอิสระ และเมื่อพิจารณาฤทธิ์สมานแผล และความเป็นพิษที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยการทดสอบความเป็นพิษจะพิจารณาความเข้มข้นที่มี % cell viability 80% ขึ้นไปจึงถือว่าสารทดสอบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HDFb ซึ่งพบว่า quercetin ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ curcuminoids เข้มข้น 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นความเข้มข้นที่มี % cell viability มากกว่า 80% แสดงให้เห็นว่า quercetin มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า curcuminoids โดยที่ curcuminoids ควรใช้ความเข้มข้นที่ไม่เกิน 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จึงจะมีความเหมาะสมและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารผสมเมื่อเรียงความเป็นพิษต่อเซลล์จากน้อยไปมากได้ผลดังนี้ สารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 3:1, 1:1 และ 1:3 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์เพื่อดูประสิทธิภาพในการรักษาบาดแผลที่ความเข้มข้น 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่า quercetin มีส่วนช่วยให้เซลล์เชื่อมติดกันได้มากที่สุดรองลงมาคือสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids อัตราส่วน 3:1 และถือว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) จึงเป็นสารที่มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการรักษาบาดแผล จะเห็นว่าทั้งการทดลองฤทธิ์สมานแผล และความเป็นพิษเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ quercetin มีความเป็นพิษน้อยและมีการเคลื่อนที่เชื่อมติดกันของเซลล์ได้ดี และสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 3:1 เป็นอัตราส่วนที่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยและมีการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ดี

จากผลที่กล่าวมาทั้ง ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผล และความเป็นพิษพบว่าการใช้สารผสม quercetin และ curcuminoids ครอบคลุมทุกฤทธิ์การทดสอบที่กล่าวมาซึ่งถือว่าให้ผลดีในการรักษาบาดแผล ในขณะที่การใช้สารเดี่ยวไม่มีฤทธิ์ ครอบคลุมทุกการทดลองข้างต้นเนื่องจากไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้สารผสมควรใช้อัตราส่วนสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่ 3:1 เนื่องจากถือว่าเป็นอัตราส่วนที่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์สมานแผลได้ดี และมีความเป็นพิษที่ต่ำซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มี quercetin สูงกว่า curcuminoids เมื่อทำการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพื่อทดสอบความสามารถในการแยก (SST) ด้วยวิธีวิเคราะห์ HPLC-UV method วิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ใน SLN base สภาพวะที่ใช้คือใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid (40 : 60 % v/v) แบบสัดส่วนคงที่ตลอดการวิเคราะห์ (isocratic elution) ใช้คอลัมน์ ACE 5 C18-AR (150 mm \times 4.6mm ID. : 5 mm) โดยใช้อัตราการไหลที่ 1.3 mL/minutes ที่อุณหภูมิ 35°C และตรวจสอบสัญญาณที่ความยาวคลื่น 390 nm ฉีดสารทดสอบ 20 μl ระยะเวลาในการฉีดแต่ละเข็มเท่ากับ

20 นาที พบว่าเป็นระบบที่มีความสามารถเหมาะสมในการแยกตามข้อกำหนด ICH guideline 2005 และพบว่าใช้ระยะเวลาในการแยกสารน้อยกว่าสภาวะอ้างอิงที่นำมาปรับใช้และเมื่อพิจารณาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical methodology validation) จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์, LOD, LOQ, Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานตาม ICH guideline 2005 และ AOAC guideline 2002 จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์และสามารถนำไปต่อยอดในงานตรวจวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids เมื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของ SLN โดยการใช่วิธีวิเคราะห์เดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการนำสารสกัด quercetin และ curcuminoids มาพัฒนาเป็นตำรับที่มีประสิทธิภาพครอบคลุมการรักษาบาดแผลได้ทั้ง 3 ระยะแต่อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาระบบนำส่งที่มีฤทธิ์ครอบคลุมกระบวนการรักษาบาดแผลทั้ง 3 ระยะและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HDFb และอาจต้องทำการวิจัยศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยในมนุษย์

บรรณานุกรม

- AOAC guideline for single laboratory. (2002). *Validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals*.
- Bicudo, R. C. S., & Santana, M. H. A. (2012). Effects of Organic Solvents on Hyaluronic Acid Nanoparticles Obtained by Precipitation and Chemical Crosslinking. *Nanoscience and Nanotechnology*, 12, 1-9.
- Brown, K. L., & Phillips, T. J. (2010). Nutrition and wound healing. *Clinics in Dermatology*, 28, 432-439.
- Cell Applications. (2018). Human Dermal Fibroblasts: HDF. Retrieved from <https://www.cellapplications.com/human-dermal-fibroblasts-hdf>
- Dechawut, W., Nitat, N., Taweesak, R., & Phannika, K. (2558). An Algorithm for Hemocytometer Cell Counting based on Image Processing Technique and DBSCAN. *Information Technology Journal*, 11(2), 56-61.
- Hayati, G., Dumrul, G., Reyhan, M., Abdullah, G., Tekin, T., & Aynur, E. T. (2013). Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health*, 1-5.
- ICH Harmonised tripartite guideline. (2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1) Current step 4 version*.
- Jat, R. C., Jain, S., & Arora, K. (2015). Formulation characterization of mucoadhesive microspheres of quercetin dihydrate *Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3).
- Lee, F. A., Mun, F. Y., Yvonne, T. T. F., Peh, K. K., & Yusrida, D. (2014). HPLC Method for Simultaneous Quantitative Detection of Quercetin and Curcuminoids in Traditional Chinese Medicines *Pharmacopuncture*, 17(4), 36-49.
- Patel, M. B., Rai, P. D., & Mishra, S. H. (2019). Assessment of anti-oxidant and wound healing potential of Eclipta alba. *Natural Remedies*, 9(9), 21 - 26.
- Rajkumar, R. J., Nadar, M. M., & Selvakumar, P. M. (2018). Plant-Derived Compounds for Wound Healing- A Review. *Organic & Medicinal Chemistry*, 5(1), 1-3.

- Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., & Sri, D. N. (2015). A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(10), 7-19.
- Sukandar, E. Y., Kurniati, N. F., Puspatriani, K., & Hanung, P. A. (2017). Antibacterial Activity of Curcumin in Combination with Tetracycline Against *Staphylococcus aureus* by Disruption of Cell Wall. *Medicinal Plants*(12), 1-8.
- Ucisik, M. H., Seta, K., Schuster, B., & Sleytr, U. B. (2013). Characterization of CurcuEmulsomes: nanoformulation for enhanced solubility and delivery of curcumin. *Nanobiotechnology*, 11(37), 1-13.
- Wani, T. U., Rashid, M., Kumar, M., Chaudhary, S., Kumar, P., & Mishra, N. (2014). Targeting Aspects of Nanogels: An Overview. *Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 7(4), 2611-2630.
- กรกนก สุวรรณราช. (2018). การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. *เภสัชศาสตร์อีสาน*, 14 (4), 132-141.
- โกสินทร์ วิระษร, กุลธิดา กล้ารอด, ประณิธิ หงส์ประภาส, & พัชรี บุญศิริ. (2557). ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลและสารต้านออกซิเดชันกับโรคมะเร็ง. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 29(2), 207-219.
- จันทร์พร ทองเอกแก้ว. (2556). บัวยกสมุนไพรมากคุณประโยชน์. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 15(3), 70-75.
- ดวงกมล เรือนงาม. (2557). การคัดเลือกสารพันธุศาสตร์สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ประสิทธิภาพสูง. *คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*, กรุงเทพฯ.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2013). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275-286.
- เบญจมาศ จิตรสมบุญ. (2010). การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน. *มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา*.
- ประสาทพรม บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร, & สาทร พรตระกูลพัฒน์. (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. Paper presented at the *ขอนแก่น: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ณ ห้องประชุมใหญ่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*.

พินิตา ไญ่ธรรมสาร. (2560). ขมิ้นชันสมุนไพรรักษาความงาม. ครอบรู้เรื่องสมุนไพรรักษา. กรุงเทพฯ:คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ไม่ปรากฏเลขหน้า.

วันเฉลิม จงศิริวัฒนา. (2561). การหายของแผล. ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. Retrieved from

http://meded.psu.ac.th/binla/class05/388_531/Wound_Healing/index1.html

สุมิตรา พงษ์ศิริ. (2561). บาดแผลและการหายของบาดแผล. เอกสารประกอบการสอนกระบวนวิชา ศัลยศาสตร์ของปาก 1, 1-20

อมรรัตน์ สีสุทอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, & ศรีสุดา หาญภาคภูมิ. (2559). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิด. วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, 11(1), 69-82.



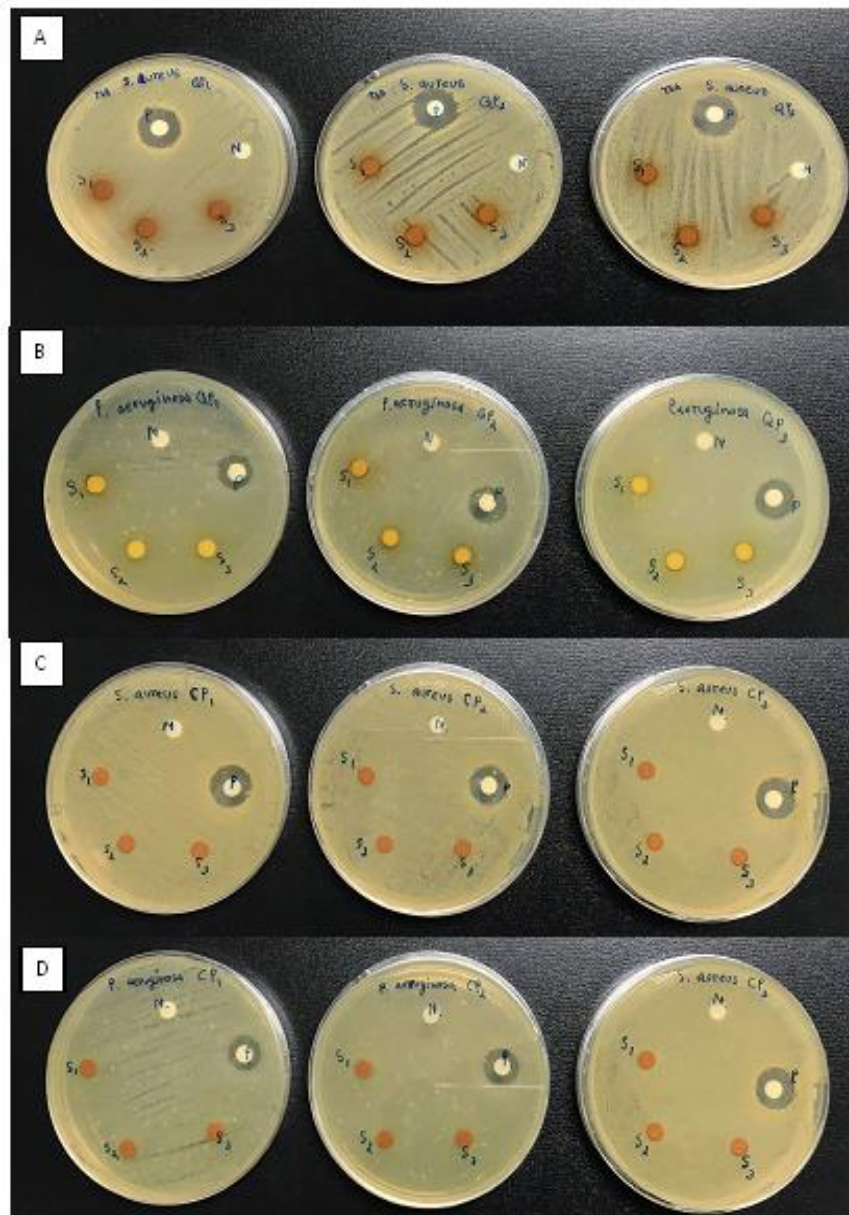


ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ข้อมูลการวิจัย



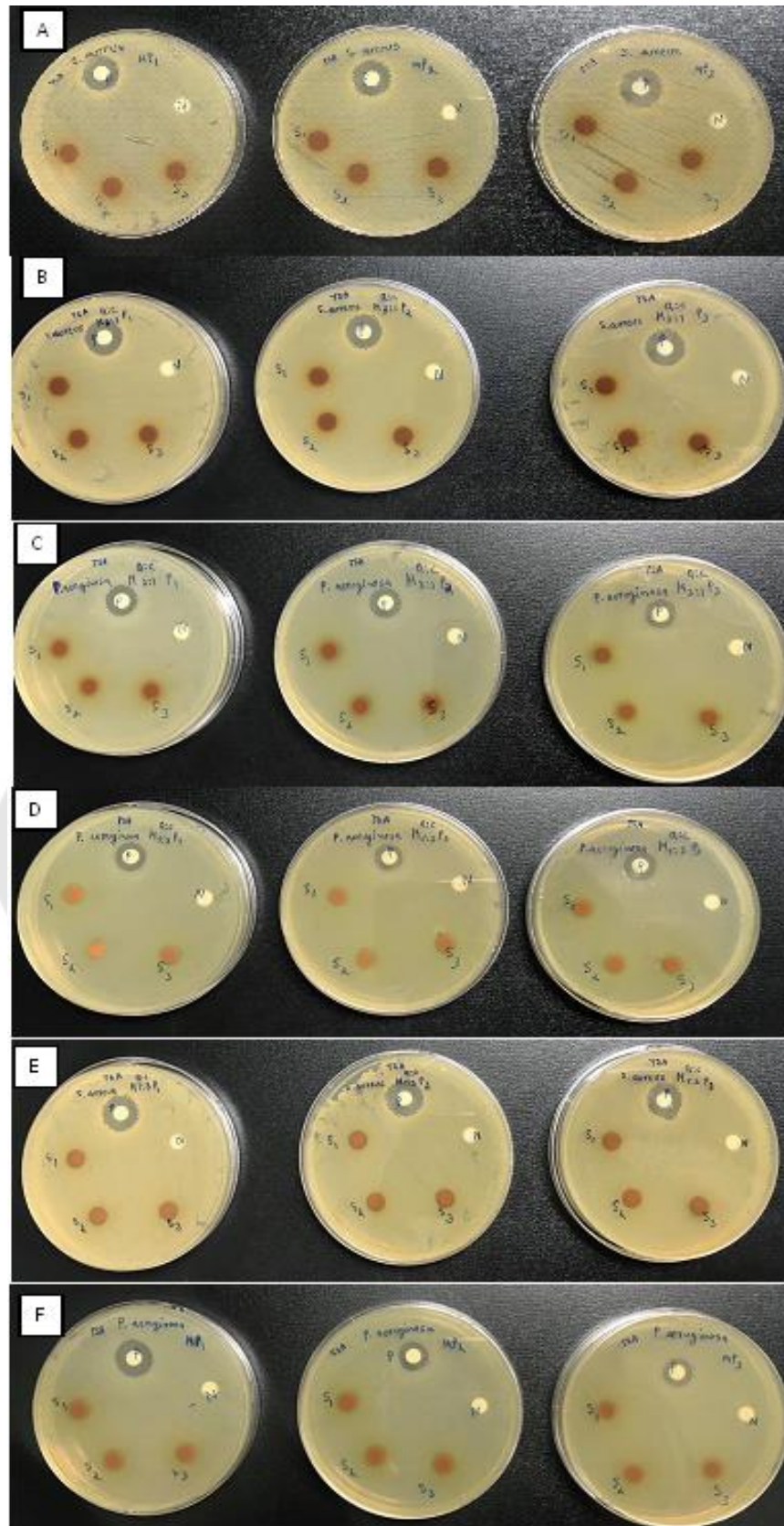
ภาพประกอบ 1 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 สารเดี่ยว

A = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของ quercetin

B = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ของ quercetin

C = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของ curcuminoids

D = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ของ curcuminoids



ภาพประกอบ 2 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8013 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 ของสารผสม

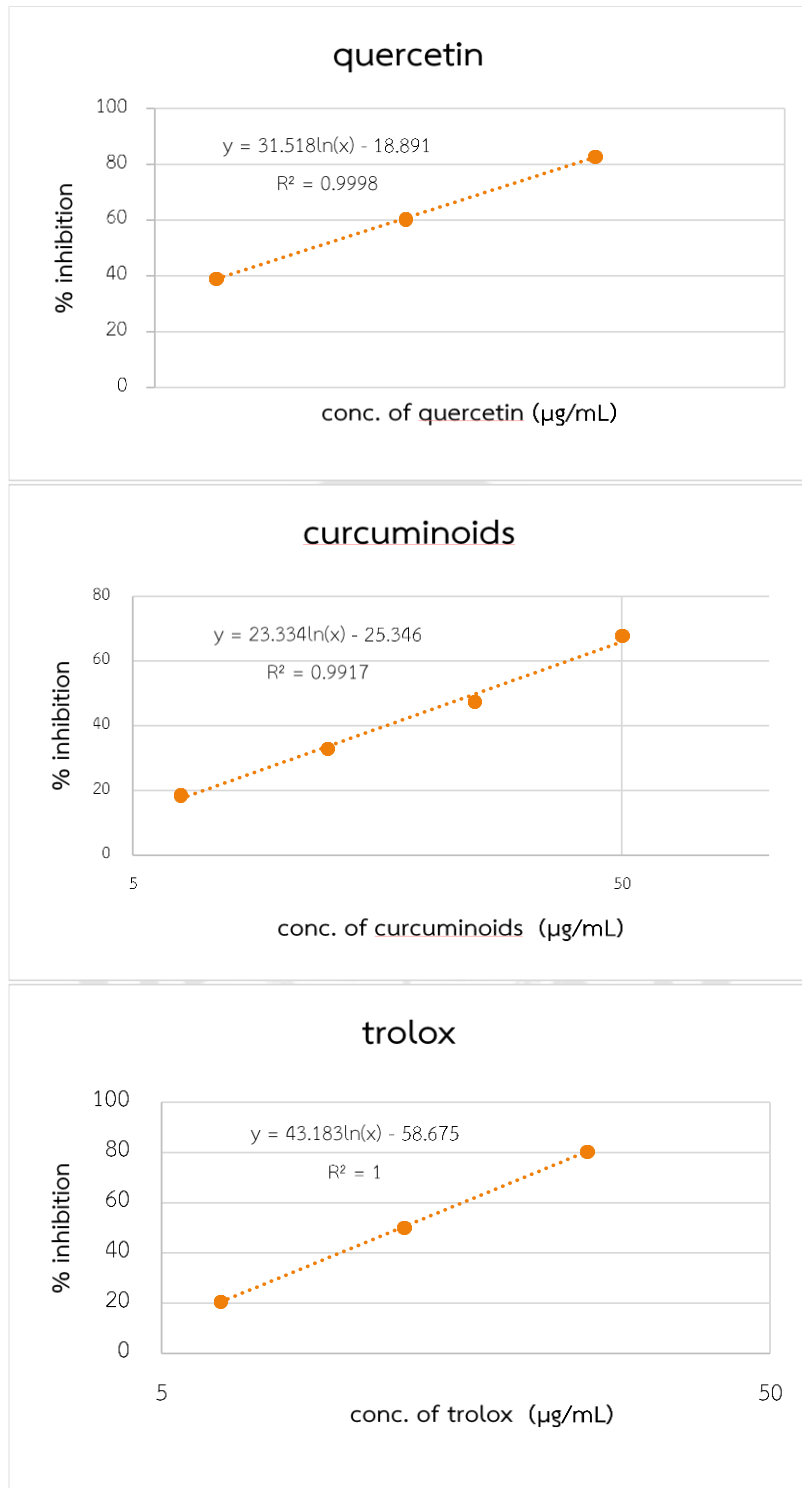
- A = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของ quercetin:curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1
 B = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ของ quercetin:curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1
 C = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของ quercetin:curcuminoids ที่อัตราส่วน 3:1
 D = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ของ quercetin:curcuminoids ที่อัตราส่วน 3:1
 E = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของ quercetin:curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:3
 F = ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ของ quercetin:curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:3

ตาราง 1 แสดงค่า %inhibition, IC₅₀ และค่า TEAC ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH•)

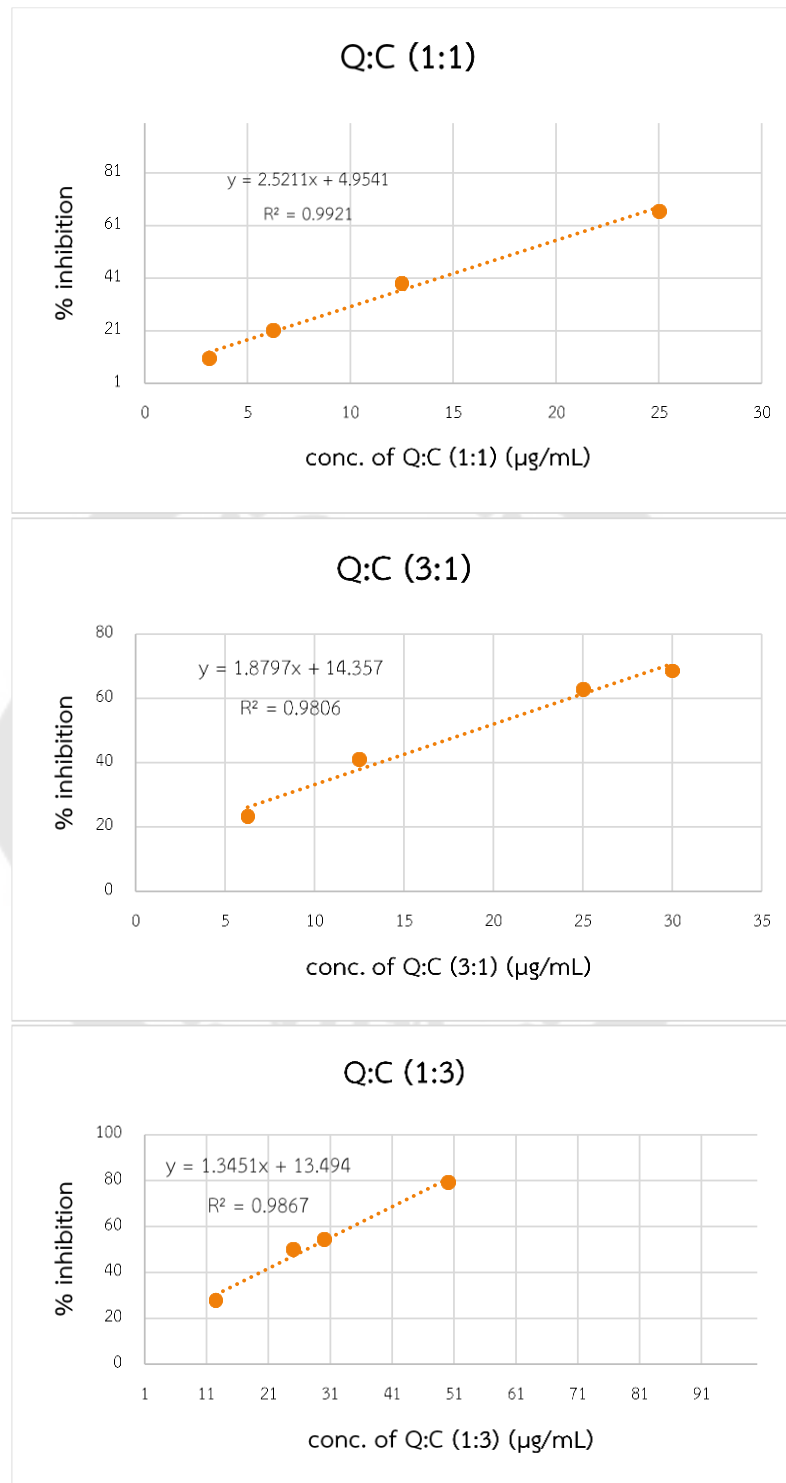
sample	Conc. (µg/mL)	% inhibition±SD	IC ₅₀ (µg/mL)	TEAC
quercetin	1.500	14.69±5.78	8.90	1.39
	3.125	26.38±6.83		
	6.250	39.04±1.07		
	12.500	60.38±4.17		
	25.00	82.73±8.19		
curcuminoids	3.125	10.22±0.72	25.26	0.49
	6.250	18.63±1.48		
	12.500	32.97±3.63		
	25.000	47.35±2.31		
	50.000	67.75±6.82		
trolox	1.500	7.048±6.4	12.39	-
	3.125	13.84±5.54		
	6.250	20.57±6.24		
	12.500	50.18±3.85		
	25.000	80.43±2.00		

ตาราง 1 (ต่อ)

Q:C (1:1)	3.125	10.67±1.81		
	6.250	21.41±2.82		
	12.500	39.19±5.43		
	25.000	66.72±4.09	17.87	0.69
	30.000	72.52±2.39		
	50.000	93.65±0.66		
Q:C (3:1)	3.125	12.80±4.00		
	6.250	23.35±1.50		
	12.500	41.15±3.34		
	25.000	62.89±1.77	18.96	0.65
	30.000	68.67±3.12		
	50.000	90.24±3.61		
Q:C (1:3)	3.125	9.01±5.03		
	6.250	15.35±3.96		
	12.500	27.86±4.88		
	25.000	50.64±3.17	27.14	0.46
	30.000	54.87±6.10		
	50.000	78.85±4.96		



ภาพประกอบ 3 แสดงสมการเส้นตรงของ quercetin , curcuminoids และ trolox ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH•)



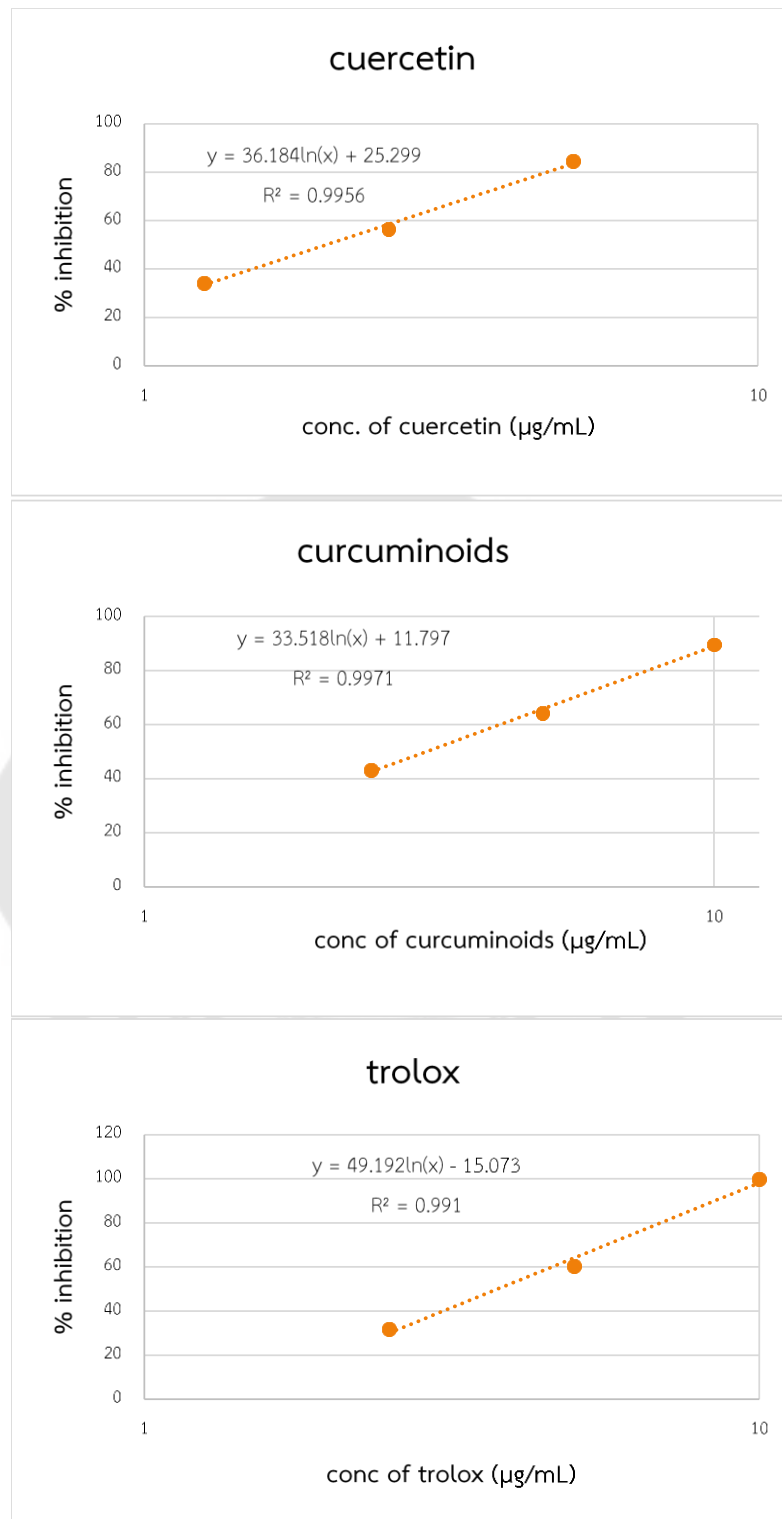
ภาพประกอบ 4 แสดงสมการเส้นตรงของสารผสม quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH•)

ตาราง 2 แสดงค่า %inhibition, IC₅₀ และค่า TEAC ของ quercetin, curcuminoids, trolox และสารผสม quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS•+)

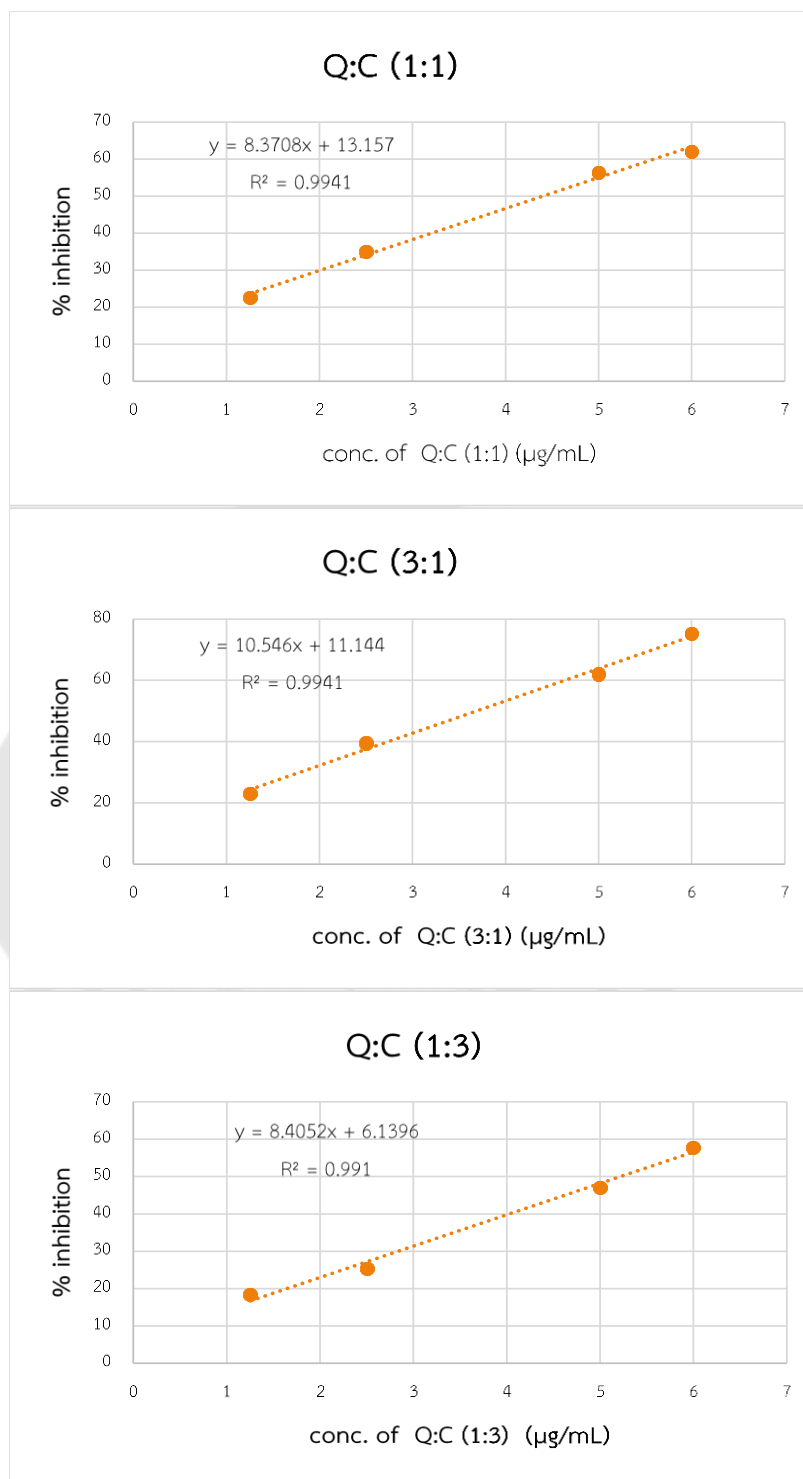
sample	Conc. (µg/mL)	% inhibition±SD	IC ₅₀ (µg/mL)	TEAC
quercetin	0.313	14.49±4.68		
	0.625	21.60±4.89		
	1.250	34.32±7.33	1.979	1.90
	2.500	56.52±3.51		
	5.000	84.50±6.95		
curcuminoids	1.250	29.97±2.92		
	2.500	43.24±3.94		
	5.000	64.29±3.62	3.13	1.20
	10.000	89.70±5.20		
	15.000	91.09±2.63		
trolox	1.250	19.02±4.21		
	2.500	31.88±2.52		
	5.000	60.35±2.72	3.75	-
	10.000	100.07±0.58		
	15.000	101.43±3.63		
Q:C (1:1)	0.625	13.19±2.43		
	1.250	22.58±2.65		
	2.500	35.10±3.30		
	5.000	56.42±3.87	4.40	0.85
	6.000	62.01±7.21		
	10.00	81.23±5.90		

ตาราง 2 (ต่อ)

Q:C (3:1)	0.625	16.58±1.85		
	1.250	23.20±2.09		
	2.500	39.56±3.71		
	5.000	62.07±7.34	3.68	1.02
	6.000	75.30±4.15		
	10.00	94.08±4.53		
	Q:C (1:3)	0.625	11.67±2.27	
1.250		18.27±1.62		
2.500		25.27±3.05		
5.000		47.07±0.44	5.22	0.72
6.000		57.93±4.11		
10.000		75.50±6.61		

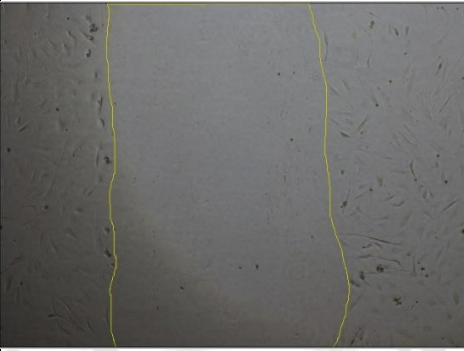

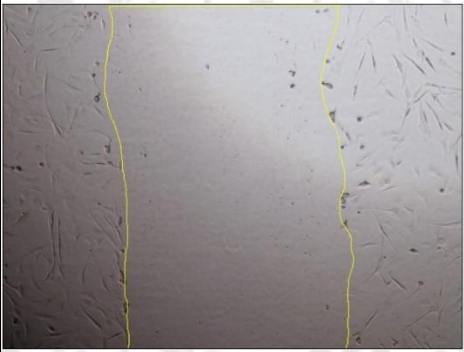
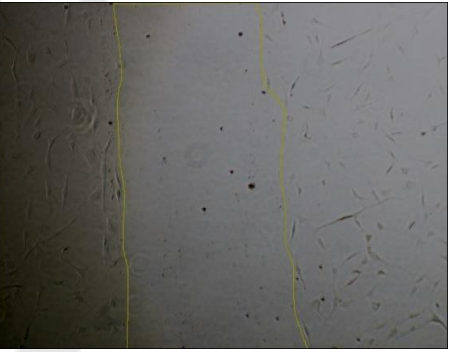




ภาพประกอบ 5 แสดงสมการเส้นตรงของ quercetin , curcuminoids และ trolox ด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS•+)

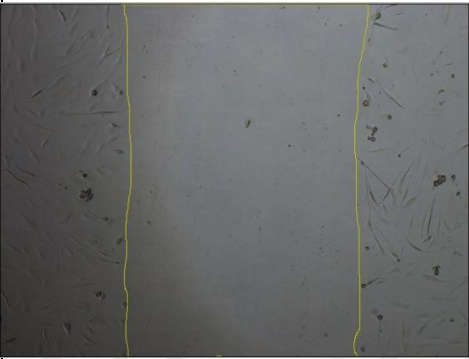

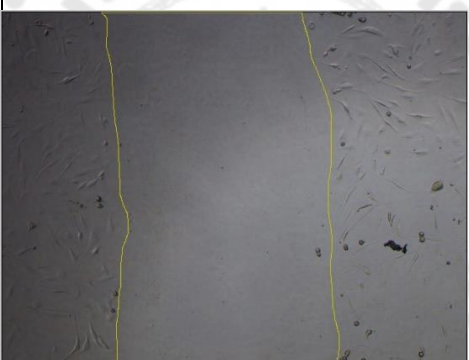

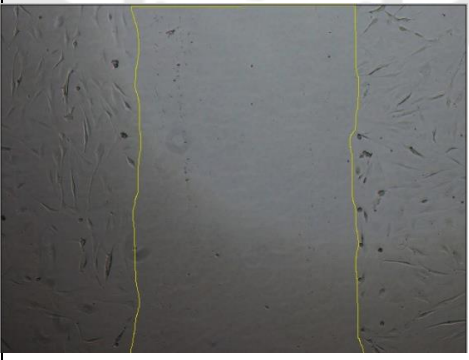



ภาพประกอบ 6 แสดงสมการเส้นตรงของสารผสมระหว่าง quercetin และ curcuminoids ที่อัตราส่วน 1:1, 3:1 และ 1:3 ด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS•+)

ตาราง 3 แสดงภาพการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

sample	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Day 0	Day 1
quercetin	7.5		
curcumoids	7.5		
Q:C (1.1)	7.5		

ตาราง 3 (ต่อ)

sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Day 0	Day 1
Q:C (3.1)	7.5		
Q:C (1.3)	7.5		
Control (DMSO)	1.25%		

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	อมรรัตน์ แมนไธสง
วัน เดือน ปี เกิด	26 สิงหาคม 2533
สถานที่เกิด	มหาสารคาม
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2556 การแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ จาก มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

